

INAUGURAL – DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

NATURWISSENSCHAFTLICH – MATHEMATISCHEN

GESAMTFAKULTÄT

DER

RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG

VORGELEGT VON

DIPL.-CHEM. NADINE PERSCHMANN

AUS BERLIN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 08. 12. 2010

**SYNTHESE UND QUANTITATIVE ANALYSE VON
STRUKTURIERTEN UND FUNKTIONELLEN
HYDROGELSYSTEMEN ZUR REGULIERUNG DER
ADHÄSIONSEIGENSCHAFTEN
UNTERSCHIEDLICHER ZELLPHÄNOTYPEN AN
GRENZFLÄCHEN**

GUTACHTER: PROF. DR. JOACHIM P. SPATZ

APL. PROF. DR. REINER DAHINT

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
μ	Viskosität
ρ_{Mizelle}	Mizelldichte
σ	elektrische Leitfähigkeit; Oberflächenspannung
χ	Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter
γ_{12}	Grenzflächenenergie
θ	Phasenwinkel
Ψ_6	Ordnungsparameter
A	Partikelabstände
Au	Gold
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (Rasterkraftmikroskopie)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserum Albumin)
BSE	<i>back scattered electron</i> (Rückstreuelektron)
Ca	Kapillarzahl
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> (Zelladhäsions-Molekül)
cmc	kritische Mizellkonzentration (<i>critical micellar concentration</i>)
Cyto D	Cytochalasin D
Da	Dalton, 1 Da = 1 u = 1.660 10 ⁻²⁷ kg
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
E _y	Elastizitätsmodul, Youngsches Modul
EZM / ECM	extrazelluläre Matrix / extracellular matrix
FBS	fötales Rinderserum

Abkürzungsverzeichnis

FCS	fötales Kälberserum
FFT	<i>fast fourier transformation</i> (schnelle Fourier-Transformation)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	gebunden (Parasiten-Experimente)
ng	nicht gebunden (Parasiten-Experimente)
GOPTES	3-Glycidyloxypropyltriethoxysilan
GUZS	gegen den Uhrzeigersinn (kreisender Parasit)
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Filmhöhe
Jas	Jasplakinolid
L	Beladungsrate der Mizellen mit Goldsalz
LLD	Landau, Levich und Derjaguin
M_w	mittleres Molekulargewicht
M_n	Zahlenmittel der Molmasse
P2VP	Poly-2-vinylpyridin
PS	Polystyrol
PFA	Paraformaldehyd
p.a.	<i>zur Analyse</i> (Grad der Reinheit)
PEG-DA	Polyethylenglycol-Diacrylat
PDMS	Polydimethylsiloxan
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage
REF	<i>rat embryonic fibroblast</i> (Rattenembryonen-Fibroblasten)
RT	Raumtemperatur
RPMI	Medium (Formulierung vom Roswell Park Memorial Institute)
RGD	R = Arginin, G = Glycin, D = Aspartat
RGE	R = Arginin, G = Glycin, E = Glutaminsäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

Abkürzungsverzeichnis

S6	<i>Sporozoite Induced Protein</i>
SAM	selbst angeordnete Monolagen (<i>self assembled monolayers</i>)
SE	Sekundärelektronen im REM
REM	Rasterelektronenmikroskop
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TRAP	<i>thrombospodin-related anonymous protein</i>
TLP	<i>TRAP-like proteine</i> (TRAP-ähnliches Protein)
v	Zuggeschwindigkeit
w	" <i>waver</i> ", suchend (einseitig gebundener Parasit)
wt	Wildtyp
Z	Aggregationszahl

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT	1
ABSTRACT.....	2
I ZUSAMMENFASSUNG	1
II SUMMARY	5
1 EINLEITUNG UND MOTIVATION	9
2 KENNTNISSTAND.....	15
2.1 Nanotechnologie und Nanobiotechnologie	15
2.2 Mizellare Nanolithographie.....	16
2.2.1 Techniken zur Strukturierung im Nanometer-Maßstab.....	16
2.2.2 Grundlagen zu Oberflächeneigenschaften	17
2.2.3 Amphiphile Diblock Copolymere.....	18
2.2.4 Bildung von Mizellen.....	21
2.2.5 Mizellen als chemische Nanoreaktoren.....	22
2.2.6 Strukturbildung auf Substratoberflächen	23
2.2.7 Faktoren zur Bestimmung der Partikelabstände	26
2.2.8 Ordnungsparameter.....	29
2.3 Funktionalisierung von Oberflächen.....	32
2.3.1 Selbstorganisierte Monolagen	32
2.3.2 Monolagen von Thiolen auf Gold.....	33
2.3.3 Silanisierung von hydroxyterminierten Substraten	36
2.3.4 Mikrokontakt-Drucken (<i>Microcontact-printing</i>).....	39
2.4 Polyethylenglykol (PEG)	40
2.4.1 Proteinabweisende Eigenschaft von PEG	41
2.4.2 Hydrogele.....	42
2.4.3 Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)-Hydrogele.....	45
2.5 Zelladhäsion und Zellbewegung	50
2.5.1 Die Extrazelluläre Matrix (EZM).....	50
2.5.2 Transmembranrezeptoren.....	56

Inhaltsverzeichnis

2.6	Malaria und biophysikalische Eigenschaften des Malaria Parasiten	62
2.6.1	Malaria	62
2.6.2	Biologie und Lebenszyklus des Malaria Parasiten	64
2.6.3	Zytoskelett und Motilität von <i>Plasmodium</i> Sporozoiten.....	67
3	MATERIALIEN UND ANALYSEMETHODEN	74
3.1	Verwendete Chemikalien.....	74
3.2	Verwendete Materialien	75
3.3	Verwendete Geräte und Methoden	75
3.3.1	Sputter Coater	75
3.3.2	Plasmasysteme.....	76
3.3.3	Kritisch-Punkt-Trockner.....	77
3.3.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	78
3.3.5	AFM (Atomic Force Microscopy = Rasterkraftmikroskopie)	81
3.3.6	Mikroskope und Software.....	81
3.3.6	Quarzkristall-Mikrowaage (QCM-D).....	82
4	EXPERIMENTELLER TEIL	86
4.1	Materialwissenschaftlicher Teil.....	86
4.1.1	Reinigung und Aktivierung der Glassubstrate	86
4.1.2	Präparation der H ₂ AuCl ₄ -beladenen mizellaren Lösung.....	86
4.1.3	Strukturelle Dekoration der Glassubstrate mit Gold-Nanopartikeln	87
4.1.4	Ätzen der Glasfasern.....	89
4.1.5	Synthese von Polyethylenglykolen mit terminalen Acrylatfunktionen (PEG-DA).....	89
4.1.6	PEG-DA-Polymerisation	90
4.1.7	Übertragung der Gold-Nanopartikel.....	91
4.1.8	Funktionalisierung der Glassubstrate mittels Siloxan-Linker.....	91
4.1.9	Präparation der nanostrukturierten Hydrogelsubstrate zur experimentellen Anwendung	92
4.1.10	Präparation der nanostrukturierten Hydrogelröhren.....	94
4.1.11	Mikrostrukturierte Proteinimmobilisierung auf Goldstrukturen mittels <i>Microcontact printing</i>	96
4.1.12	Biofunktionalisierung der Goldstruktur mittels c(RGDfK)-thiol	96
4.1.13	Partielle (halbseitige) Funktionalisierung der Hydrogele mittels Carboxyfunktionen	97
4.1.14	Präparation der Carboxy-funktionalisierten Hydrogelsubstrate zur experimentellen Anwendung.....	97
4.1.15	Mikrostrukturierte Anordnung von Carboxyfunktionen auf Hydrogelsubstraten.....	98
4.1.16	Präparation der mikrostrukturierten Anordnung von Carboxyfunktionen auf Hydrogelsubstraten zur experimentellen Anwendung	99
4.1.17	Anbindung des fluoreszenten Fibronectin-FITC an Carboxygruppen	100

Inhaltsverzeichnis

4.1.18	Kopplung der Peptide an Carboxy-funktionalisierte Hydrogele	101
4.6	Zellkultur.....	101
4.6.1	Kultivieren von Zellen und Vorgehensweise in der Zellkultur.....	101
4.6.2	Setzen der Zellen auf Substratoberflächen	102
4.6.2	Immunozytochemisches Anfärben von Zellen	103
4.7	Sporozoiten-Kultur.....	103
4.7.1	Präparation der Sporozoiten.....	103
4.7.2	Setzen der Sporozoiten auf Substratoberflächen	104
4.7.3	Setzen der Sporozoiten in Mikroröhren	105
4.7.4	Kritische-Punkt-Trocknung von <i>Plasmodium</i> Sporozoiten für REM-Aufnahmen.....	105
4.8	Proteinabweisende Eigenschaften kovalent gebundener PEG-Beschichtungen	106
4.8.1	Anbindung der PEG-Derivate an Sensor-Quarzkristalle.....	106
4.8.2	Quarzkristall-Mikrowaagen (QCM) Messungen	109
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	110
Teil I Charakterisierung proteinabweisender Eigenschaften kovalent gebundener PEG-Beschichtungen.....		
110		
5.1	Charakterisierung der proteinabweisenden Eigenschaften unterschiedlicher PEG-Derivate mittels QCM.....	110
Teil II Entwicklung multivariabler Hydrogeloberflächen		
114		
5.2	Chip mit Stempelstruktur	114
5.2.1	Charakterisierung der Gold-nanostrukturierten Oberflächen.....	114
5.2.2	Charakterisierung und Anbindung der PEG-DA-Hydrogele.....	116
5.2.3	Übertragung der Goldstrukturen auf glasgebundene Hydrogele.....	121
5.2.4	Stempeln von Mikrostrukturen auf Goldpartikel.....	122
5.2.5	Variable Kombination der Parameter auf einem multivariablen Chip-Substrat.....	124
5.3	Funktionalisierung der Hydrogele mittels Carboxy-funktionen.....	127
5.3.1	Partielle Funktionalisierung der Hydrogeloberflächen	127
5.3.2	Funktionalisierung von Hydrogelen in mikrostrukturierter Anordnung.....	130
5.4	Strukturierung gekrümmter Oberflächen.....	131
Teil III Biologische Anwendung		
136		
5.5	<i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf multivariablen Hydrogel-systemen	136
5.5.1	Bewegungsverhalten von <i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf reinen PEG-DA-Hydrogelen	138
5.5.2	Analyse von <i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf reinen PEG-DA-Hydrogelen mit unterschiedlichen Elastizitäten	139

Inhaltsverzeichnis

5.5.3	Analyse von <i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf elastischen Substratoberflächen unter Einfluss von Jasplakinolid	142
5.5.3	Analyse von <i>TLP(-)-Plasmodium</i> Sporozoiten auf elastischen Substratoberflächen	145
5.5.5	Passivierende Wirkung der Hydrogele auf <i>Plasmodium</i> Sporozoiten.....	154
5.5.5	Gleitverhalten von <i>Plasmodium</i> Sporozoiten in Abhängigkeit der Goldpartikelabstände (Linkerdichte)	160
5.5.6	<i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf nanostrukturierten Substratoberflächen unter Einfluss von Jasplakinolid und Cytochalasin D	163
5.5.7	<i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf nanostrukturierten Hydrogelsubstraten mit unterschiedlichen Elastizitäten	169
5.5.8	Gleitverhalten von <i>TLP(-)-Plasmodium</i> Sporozoiten in Abhängigkeit der Goldpartikel-Abstände (Linkerdichte)	170
5.5.9	<i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf, mittels cRGDfk- und cRGEfk-funktionalisierten, Gold-nanostrukturierten Hydrogelsubstraten.....	172
5.5.10	<i>Plasmodium</i> Sporozoiten auf, mit unterschiedlichen Proteinen, funktionalisierten Hydrogelen.....	174
5.6	<i>Plasmodium</i> Sporozoiten in nanostrukturierten Hydrogelröhren mit unterschiedlichem Durchmesser	176
7.	FAZIT UND AUSBLICK	179
7.1	Fazit Teil I: Charakterisierung proteinabweisender Eigenschaften kovalent gebundener PEG-Beschichtungen	179
7.2	Fazit Teil II: Entwicklung multivariabler Hydrogeloberflächen.....	179
7.3	Fazit Teil III: Biologische Anwendung.....	181
7.4	Ausblick.....	183
7.	LITERATURVERZEICHNIS	185

Abstrakt

Der Fokus dieser Arbeit ist auf die Entwicklung eines künstlichen Modellsystems der extrazellulären Matrix (EZM) gerichtet, um die Reaktion diverser Zellphänotypen auf unterschiedliche Umweltbedingungen zu erfassen. Die Imitation der verschiedenen biochemischen sowie biomechanischen Eigenschaften von Gewebe durch das hier definierte System, diente dabei zur Untersuchung des Adhäsions- und Bewegungsverhaltens von Malaria Parasiten, speziell des *Plasmodium* Sporozoiten Stadiums, da diese nach Injektion durch die *Anopheles* Mücke zunächst Gewebe passieren müssen bevor sie in die Blutbahn gelangen¹⁶⁹. Die Basis des Modellsystems stellt ein proteinabweisendes Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) Hydrogel dar, dessen Elastizität in einem Bereich von 0,6 kPa bis 6 MPa einstellbar ist. Die Hydrogeloberfläche wurde durch einen Transferprozess mit Goldnanopartikeln dekoriert, welche zuvor mittels Block-Copolymer-Nanolithographie in einer quasi-hexagonalen Ordnung mit gezielt justierbaren Partikelabständen von 40 nm bis 270 nm auf Glas generiert wurden. Diese Goldpartikel wurden über Thiolbindungen mit verschiedenen bioaktiven Molekülen funktionalisiert und fungierten hier als Adhäsionsanker, welche in definierten Abständen und somit unterschiedlicher Dichte angeboten werden können. Eine weitere Modifikation der Hydrogeloberfläche wurde durch Carbonsäure-Funktionen erzielt. Diese konnten in bestimmten Bereichen der Geloberfläche, beispielsweise in Form einer Mikrostruktur, erzeugt werden und anschließend über Peptidbindungen mit entsprechenden Molekülen weiter umgesetzt werden. Erstmals wurde eine Anbindung der unterschiedlich elastischen und funktionalisierten Hydrogele in Form dünner Schichten auf dünne Glassubstrate ermöglicht. Hierdurch konnten verschiedene Parameter, wie Elastizität, Abstände der Adhäsionsanker und Funktionalisierungen unabhängig voneinander in zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten auf einem Glassubstrat variiert werden. Diese Methode erbrachte große Vorteile für die Mikroskopie und Substrathandhabung.

Die Untersuchung der *Plasmodium* Sporozoiten auf diesen Substraten zeigte die höchste Motilität dieser Parasiten auf Oberflächen mit Adhäsionsabständen von 55-100 nm und einer Elastizität entsprechend derer von Zellkulturplastik. Durch Zugabe eines Aktin-polymerisationsfördernden Wirkstoffes konnte die Motilität auf weicheren Substraten jedoch stimuliert werden. Das hier entwickelte System ermöglichte damit erstmals einen experimentellen Nachweis der Synergie zwischen Adhäsionsbildung und der Aktinpolymerisation und trägt durch die Möglichkeit der

Untersuchung zahlreicher Faktoren entscheidend zum besseren Verständnis des Bewegungsmechanismus der Malariaerreger bei.

Abstract

This thesis focuses on the development of an artificial model system of the extracellular matrix (ECM) to probe the response of diverse cell phenotypes to different environmental conditions. Specifically, diverse biochemical and biomechanical conditions of tissues were imitated using this system to investigate the adhesion and motility behavior of Malaria parasites. These so-called *Plasmodium* sporozoites are known to traverse tissue after injection by a mosquito before they invade into blood vessels. The basis of this model system is a protein-repellent poly(ethylene glycol)diacrylate (PEG-DA) hydrogel, the elasticity of which can be varied in a range of 0.6 kPa to 6 MPa. Using a transfer process, the hydrogel surface was decorated with gold-nanoparticles, which had originally been generated on glass in a quasi-hexagonal order with tunable inter-particle distances from 40 nm to 270 nm via block copolymer micellar nanolithography (BCMNL). Through thiol bonds, these gold particles were functionalized with different bioactive molecules and thus acted as adhesion anchors, offered with variable density due to the ability to tune the inter-particle spacings. Further modification of the hydrogel surface was realized via carboxylic acid functions, which could be manufactured directly on specific areas of the gel surface, for example in the form of a microstructure, and further can be linked with bioactive molecules like proteins. For the first time, the parameters described above (hydrogel elasticity, adhesion anchor spacing, and surface functionalization) have been varied independently on the surface of a single glass substrate by linking different pieces of thin hydrogels together. This advancement provides great advantages in microscopy and substrate handling.

On these substrates *Plasmodium* sporozoites showed the highest motility on surfaces with adhesion distances from 55-100 nm and an elasticity corresponding to cell culture plastic. Through addition of an actin-polymerization promoter, the motility on soft substrates could be stimulated. Using the developed system, experimental evidence was generated showing the synergy between adhesion-formation and actin-polymerization. The investigation of numerous factors is enabled with this system, the results of which will contribute to a better understanding of the motility mechanism of Malaria pathogens.

I Zusammenfassung

Bei allen Lebewesen sind überlebenswichtige Vorgänge grundlegend von speziellen Funktionen unterschiedlicher Zellsysteme abhängig. Dabei werden Zellfunktionen wie Adhäsion, Motilität, oder Differenzierung insbesondere durch die Eigenschaften der extrazellulären Matrix bestimmt. Entscheidende Faktoren der Zellumgebung sind hierbei die mechanischen, strukturellen und chemischen Parameter.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modellsystem der extrazellulären Matrix zu entwickeln, welches eine gezielte Manipulation dieser Parameter erlaubt, um die Wechselwirkung von Zellen mit ihrer Umgebung und die darauf basierenden Antworten der Zellen auf molekularer Ebene zu kontrollieren, zu visualisieren und zu charakterisieren. Die mechanische Komponente dieses biomimetischen Modellsystems stellte das Polymer Polyethylenglykol (PEG) in Form eines Hydrogels dar. Dieses Trägermaterial wurde durch Gold-Nanopartikel, als strukturgebende Komponente, sowie durch bioaktive Moleküle ergänzt. Die biologisch aktiven Moleküle wurden sowohl auf Goldpartikeln, als auch direkt auf dem, zuvor mit Carbonsäuren funktionalisierten, PEG-Trägermaterial immobilisiert.

Die Wahl von Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) als Basismaterial für die verschiedenen Hydrogelsysteme beruhte sowohl auf deren proteinabweisenden, als auch auf ihren nicht-toxischen, permeablen, biokompatiblen und deformierbaren Eigenschaften sowie den hervorragenden Variationsmöglichkeiten des Gelgehalts, der Quellrate, der Maschengröße und insbesondere der Elastizität in einem Bereich von 0,6 kPa bis 6 MPa. Durch die photoinduzierte Vernetzungsreaktion der PEG-DA-Makromere zur Bildung der Hydrogele ließen sich diese Charakteristika einfach und reproduzierbar kontrollieren. Des Weiteren ermöglichte die radikalische Vernetzungsmethode zusätzliche Co-Polymerisationen und somit die Einbindung ungesättigter Linkersysteme in das Hydrogel. Diese Co-Vernetzungen waren grundlegend für die Übertragungslithographie der Gold-Nanostrukturen und für die

gezielte Oberflächenanbindung ungesättigter Fettsäuren. Insbesondere die Anbindung der Gele an feste anorganische, transparente Materialien zur besseren Handhabung, Mikroskopie und Kombinierbarkeit unterschiedlicher Gele auf einem Substrat war für das System von entscheidender Bedeutung und basierte auf der Vernetzung eines Silan-Linkersystems. Die Generierung der quasi hexagonal geordneten Gold-Nanostrukturen erfolgte mittels mizellarer Block-Copolymer-Nanolithographie und beschränkte sich auf feste, anorganische Oberflächen. Die Strukturen wurden mit definierten Partikelabständen von 40 nm bis 270 nm hergestellt und anschließend durch Verwendung eines Bis(acryloyl)cystamin-Linkers während der Kreuzpolymerisation der PEG-Makromere auf das Hydrogel übertragen. Die erfolgreiche Übertragung und die Ordnung der Nanostrukturen auf den wasserhaltigen Hydrogelsubstraten wurden mittels Cryo-Rasterelektronenmikroskopie überprüft.

Die Kopplung biologisch aktiver Moleküle, welche die dritte Komponente des Modellsystems darstellten, erfolgte an die Goldpartikel oder an das PEG-Hydrogel direkt. Die Funktionalisierung der Goldpartikel wurde über Thiolbindungen realisiert. Dabei konnten die Moleküle durch Auftragen mittels PDMS-Stempel ebenfalls in Mikrostrukturen angeordnet werden.

Die direkte Anbindung von Peptiden und Proteinen an das Hydrogel erfolgte über eine Peptidbindung. Zu diesem Zweck wurden die Hydrogele mit Carboxyfunktionen dekoriert. Diese Oberflächenfunktionalisierung wurde durch Copolymerisation ungesättigter Endfunktionen langkettiger Fettsäuren realisiert, welche zuvor auf einem hydrophilen Trägerglas abgeschieden wurden. Diese Übertragungstechnik der Carbonsäuren auf das Hydrogel ermöglichte die Funktionalisierung gezielter Bereiche. So wurden durch Aufstempeln der ungesättigten Fettsäuren auf hydrophile Übertragungsgläser und deren anschließende Übertragung ebenfalls mikrostrukturiert funktionalisierte Hydrogele hergestellt. Die Visualisierung dieser Strukturen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch

durch Anbindung von fluoreszenzmarkiertem Fibronectin. Im Weiteren wurden unterschiedliche bioaktive Moleküle, wie Fibronectin, Kollagen, Heparin und Poly-L-Lysin, angekoppelt.

Einen ebenfalls wichtigen Faktor eines zellumgebenden, künstlichen Systems stellt die Krümmung der Oberfläche dar. Diese wurde durch die Herstellung nanostrukturierter Hydrogelröhren mit unterschiedlichen Durchmessern variiert. Der wichtigste Fortschritt lag in der kompletten und hochgeordneten Nanostrukturierung von Glasfasern mit unterschiedlichen Durchmessern bis hin zu einem Durchmesser von 10 μm . Die Übertragung der Goldstruktur auf das umgebende Hydrogel wurde analog zu den flachen Substraten durchgeführt.

Diese hochvariablen Hydrogelsysteme wurden zur Untersuchung eines speziellen Zellsystems genutzt und dienten zur Charakterisierung des Adhäsions- und Bewegungsverhaltens von *Plasmodium* Sporozoiten. Diese, zur Gruppe der *Apicomplexa* gehörigen, Malaria auslösenden Parasiten wurden auf ihre Reaktion in Bezug auf verschiedene Elastizitäten der Umgebung, unterschiedliche Abstände und Dichte der Adhäsionsanker sowie Funktionalisierungen untersucht. Dabei wurde eine Präferenz für Abstände der Goldstrukturen von 55-100 nm beobachtet. Weiterhin zeigten die Experimente, dass Parasiten auf Hydrogelen, die in ihrer Elastizität der Härte von Zellkulturplastik entsprachen, das beste Fortbewegungsvermögen aufweisen. Dabei führten längere Inkubationszeiten der Sporozoiten sowie die Zugabe von Jasplakinolid, welches die Depolymerisation der Aktinfilamente hemmt, zu einem verbesserten Bewegungsvermögen auf weicheren Hydrogelen. Die Adhäsions- und Bewegungsfähigkeit auf Substraten mit unterschiedlichen Funktionalisierungen, wie Fibronectin, Kollagen, Heparin und Poly-L-Lysin, erwies sich als unspezifisch. Die Parasiten konnten sich entgegen der bisherigen Meinung, dass BSA Voraussetzung für eine Fortbewegung *ex vivo* ist, auf sämtlichen Peptiden in Abwesenheit von BSA kreisend bewegen.

Um die Rolle von Oberflächenproteinen genauer zu überprüfen, wurden die Experimente ebenfalls mit *TLP* (-) (*TRAP-Like-Protein*) -Parasiten durchgeführt. Diese Parasiten besitzen einen genetisch bedingten Mangel an TLP. Hierbei wurde durch die Tatsache, dass der Einfluss von Jasplakinolid diesen Mangel deutlich kompensieren konnte, erstmals experimentell eine Verknüpfung zwischen dem Oberflächenprotein und dem dynamischen Zytoskelett gezeigt. Die Untersuchungen der *TLP*(-)-Sporoziten auf nanostrukturierten Hydrogelen ergaben bei Partikelabständen von 70 nm die besten Voraussetzungen für deren Bewegung. TLP ist entscheidend an der Adhäsionsstabilisierung beteiligt und scheint in dieser Funktion von der Adhäsionsdichte abhängig zu sein.

Als abschließende Untersuchung der *Plasmodium* Sporoziten in dieser Arbeit wurde deren Fortbewegungsverhalten in nanostrukturierten Hydrogelröhren mit unterschiedlichen Durchmessern analysiert. In diesen Modellsystemen von Blutgefäßen zeigten sie eine Anpassung der kreisförmigen Fortbewegung in Abhängigkeit der Krümmung. Diese ersten Experimente bilden die Grundlage für zukünftige Studien.

In einem Seitenprojekt wurden ergänzend Siliziumoberflächen mit unterschiedlichen, dünnen Polyethylenglykol-Filmen beschichtet, um anschließend die beste Beschichtung gegen unspezifische Proteinadsorption zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung einer Quarzkristallmikrowaage eine Proteinadsorptionsstudie durchgeführt, welche mPEG2000-Harnstoff als zuverlässige und einfach herstellbare Beschichtungsmöglichkeit charakterisiert.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte, flexible Modellsystem spiegelt die Eigenschaften der extrazellulären Matrix hervorragend wider und wurde erfolgreich zur Untersuchung des Bewegungsmechanismus der *Plasmodium* Sporoziten angewendet.

II Summary

Specific functions of different cell systems are fundamental for the survival of all life forms. In particular cell functions like adhesion, motility and differentiation are controlled by the extracellular matrix (ECM). Crucial factors contributing to the function of the ECM are mechanical, structural and chemical parameters.

The aim of this thesis was to develop a model system of the extracellular matrix, which allows a defined manipulation of these parameters to control, visualize and characterize cell response based on its interaction the environment. The mechanical component of this model system was represented by the polymer poly(ethylene glycol) (PEG) in the form of a hydrogel. This supporting material was supplemented by gold-nanoparticles, as a structural component, and by bioactive molecules as adhesion sites. These molecules were immobilized on the gold-nanoparticles, as well as directly on the PEG-substrate specifically carboxy-functionalized in advance.

Poly(ethylene glycol)diacrylate (PEG-DA) was chosen as the basic material for different hydrogel systems, because of its protein repellent, non-toxic, permeable, biocompatible and deformable properties as well as the excellent scopes of variation in respect of the gel content, swelling ratio, mesh size and especially the elasticity in a range from 0,6 kPa to 6 MPa. Photo-induced cross-linking of PEG-DA macromers for generation of hydrogels allowed an easy and reproducible control of these characteristics. Furthermore, the technique of radical cross-linking enabled an additional co-polymerization and therefore the integration of unsaturated linker-systems to the hydrogel. This co-polymerization was fundamental for the transfer lithography of gold-nanoparticles and for directed binding of unsaturated fatty acids to the surface. Particularly, the linking of hydrogels to a solid, inorganic, transparent material resulted in an improved handling, better conditions for microscopy and combinability of different hydrogels on one substrate. That was of vital importance for the system, achieved by cross-linking of a silane linkersystem.

Generation of quasi-hexagonally ordered gold-nanoparticles was based on micellar block-copolymer nanolithography and limited to solid and inorganic surfaces. Gold-nanostructures were produced with defined interparticle spacings from 40 nm to 270 nm. Subsequently, gold particles were transferred to the hydrogel by using a bis(acryloyl)cystamine-linker during cross-polymerization with PEG-DA macromers. The successful transfer of the ordered nanostructures to the water containing hydrogels was monitored via cryo-scanning electron microscopy.

Biologically active molecules, which represent the third, chemical component of the model system, were bound to gold particles or directly to the PEG hydrogel. Functionalization of gold particles was performed via thiol bonds. In addition, molecules can be ordered into microstructures using PDMS stamps for deposition.

Direct binding of peptides and proteins to the hydrogel occurred through peptide binding. For this purpose, hydrogels were decorated with carboxylic functions. This surface functionalization was realized by co-polymerization with unsaturated residues of long chain fatty acids, which were deposited on a hydrophilic glass support prior to the transfer. This transfer process enabled the functionalization of defined areas. Stamping of unsaturated fatty acid on hydrophilic glasses and then transferring allowed functionalization of hydrogels even with microstructures. Functionalized structures were visualized via fluorescence microscopy by coupling of fluorescent-labeled fibronectin to the functional groups. Furthermore, different bioactive molecules, such as fibronectin, collagen, heparin and poly-l-lysine were linked to the hydrogel.

Another important factor of the artificial cellular environment is the curvature of the surface. This curvature was varied by construction of nanostructured hydrogel tubes with different diameters in micrometer range. Important progress was achieved by the complete and highly ordered nanostructuring of glass fibers of diameters down to 10 μm . The transfer process of the gold nanostructure to the surrounding hydrogel was performed analogous to that of plane substrates.

The resulting, highly variable system was used for the investigation of a specific cell system and served for the characterization of the adhesion and motility behavior of *Plasmodium* sporozoites. This *Apicomplexan*, Malaria-causing parasite was analyzed with respect to its "mechanosensing" ability on different surface elasticities, varying distances and densities of adhesion anchors, and functionalities. Herein, a preference of interparticle spacings from 55 nm to 100 nm was observed. Furthermore, the experiments revealed the best motility on hydrogels with elasticities similar to cell culture plastic. Longer incubation of sporozoites on the surfaces and addition of jasplakinolide, which inhibits the actin depolymerization, resulted in an improved motility on softer hydrogels. Adhesion and motility on substrates with different functionalities, as fibronectin, collagen, heparin and poly-l-lysine turned out to be unspecific. In contrast to previous statements, the parasites could move *ex vivo* on all tested peptides in a circular fashion. To prove the role of surface proteins, experiments were performed with parasites lacking the Integrin like surface protein TLP (*TRAP-Like-Protein*). The fact that the influence of jasplakinolide clearly could compensate this lack of TLP experimentally showed for the first time a connection between the surface protein and the dynamic cytoskeleton. The investigation of *TLP(-)*-sporozoites on nanostructured hydrogels yielded the best motility at interparticle spacings of 70 nm. TLP is essential for the stabilization of adhesion and seems to be dependent on the adhesion density in this function.

As concluding research of the *Plasmodium* sporozoites in this thesis, the motility of these parasites was analyzed in nanostructured hydrogel tubes with different diameters. In these artificial model systems of blood vessels they showed an adaptation of the circular locomotion in dependency of curvature. These experiments present the basis for further studies.

In a side project, different poly(ethylene glycol) films were coated on silicon surfaces to identify the best coating against unspecific protein adsorption. For this purpose a

Summary

protein adsorption study was accomplished using a quartz crystal microbalance, which characterized mPEG2000-urea as reliable and easy to produce coating.

The flexible model system developed within this thesis greatly reflects the properties of the extracellular matrix and was successfully used for investigation of the motility mechanism of *Plasmodium* sporozoites.

1 Einleitung und Motivation

In den letzten Jahren gewann die gezielte Anordnung von aktiven Biomolekülen auf unterschiedlichsten Substraten für zahlreiche Anwendungsbereiche, wie beispielsweise die Erforschung von Antikörpern als Biomarker, oder Protein-Mikrostrukturen zur Funktionsermittlung¹⁻⁷, eine immer größere Bedeutung. Die meisten der bekannten Techniken zur Strukturierung, wie Dip-Pen-Nanolithographie, Rastersonden-Strukturierung⁸⁻¹¹ und fokussierte Ionenstrahl-Lithographie¹² sind jedoch auf anorganische Oberflächenmaterialien begrenzt. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der Proteinstrukturierung auf mechanisch definiert einstellbare Hydrogele erweitert, welche auf kreuzvernetzten Polyethylenglykol (PEG)-Polymeren basieren. Durch kovalente Kreuzvernetzung werden Hydrogele mit definierbaren physikochemischen Eigenschaften, wie Permeabilität, Wassergehalt und Elastizität erzeugt. Diese PEG-Hydrogele sind aufgrund ihrer nicht-toxischen, permeablen, biokompatiblen, deformierbaren und transparenten Eigenschaften bedeutende Substrate für biologische und medizinische Anwendungen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Aus diesem Grund haben sie einen hohen Stellenwert in Bereichen, wie Gewebezüchtung (*tissue engineering*), kontrolliertem Arzneimitteltransport (*drug delivery*), Implantaten und kosmetischen Artikeln oder Kontaktlinsen¹³⁻¹⁷ erlangt. Beachtenswerte Vorteile gequollener Hydrogele im Vergleich zu harten, anorganischen Substraten sind ihre physiologischen Charakteristika, welche eine Denaturierung von gekoppelten Proteinen minimieren¹⁸. Die stark hydratisierten Polymere ähneln in ihrer Biofunktionalität sowohl in Hinblick auf ihre chemischen als auch physikalischen Eigenschaften stark der natürlichen Umgebung von Zellen, der sogenannten extrazellulären Matrix (EZM). Es ist bekannt, dass mehrere chemische, biologische und physikalische Faktoren synergetisch und/oder kooperativ wirken, um bestimmte zelluläre Funktionen zu erzielen¹⁹. Die Morphologie der Zellen sowie ihr Verhalten in

Bezug auf Differenzierung, Motilität und Proliferation sind neben den biochemischen Eigenschaften der EZM ebenfalls stark durch mechanische Eigenschaften beeinflusst^{15,17}. Das Verhalten vieler Zellen auf verschiedenen weichen Materialien ist charakteristisch für bestimmte Phänotypen. So werden beispielsweise Krebszellen über ihr Wachstum auf weichen Agargelen identifiziert²¹. Aus diesem Grund wurden zahlreiche biophysikalische Modelle entwickelt, um eine Rekonstruktion und das Verständnis des Signalwegs der Konversion von mechanischen zu biochemischen Informationen zu ermöglichen²²⁻²⁴. Künstliche Systeme, welche die EZM imitieren sind somit wichtige und effektive Modelle um das aktive Verhalten unterschiedlicher Zellsysteme zu charakterisieren. Discher *et al.* zeigten beispielsweise den Einfluss unterschiedlicher Elastizitäten der Zellumgebung auf Stammzellen¹⁷. Eine wichtige Rolle für zahlreiche physiologische Prozesse, wie Immunantwort, Wundheilung und Formgebung, nimmt die gerichtete Zellbewegung ein. Es ist bekannt, dass diese unter anderem durch Gradienten chemischer Signale gelenkt werden kann²⁵. Des Weiteren demonstrierten Wang *et al.*, dass die Zellbewegung von Fibroblasten (3T3) auf Polyacrylamidsubstraten ebenfalls durch eine rein physikalische Wechselwirkung zwischen Zelle und Substrat beeinflusst wird²⁶. Neben der Untersuchung von mechanischen Einflüssen auf unterschiedliche Zellsysteme wurden neue Ansätze vorgestellt, welche biophysikalische Parameter mit biochemischen kombinieren. Discher *et al.* beschichteten elastische Substrate mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kollagen. Dabei konnten sie diese Parameter jedoch nicht unabhängig voneinander variieren. Zudem war es nicht möglich die Dichte und Abstände der Bindungsstellen im Nanometerbereich mit der gewünschten Präzision vorzugeben⁴². Durch Erweiterungen von Hydrogelen durch Goldnanostrukturen wurde eine Grundlage zur optimalen Variation kombinierter, adhäsionsrelevanter Parameter geschaffen²⁴⁵. Hervorgerufen durch ein großes Interesse an der Erforschung der intra- und extrazellulären Signalgebung, welche durch Zell-EZM-Wechselwirkung bedingt

wird, existiert derzeit eine große Nachfrage nach definiert einstellbaren Modellsystemen zur Untersuchung adhärenter Zellen^{27,24,28}.

Aufgrund der bereits gut etablierten, proteinabweisenden Eigenschaften von PEG-Hydrogelen und PEG-beschichteten Oberflächen^{29 - 33 ,230} (Kap. 5.1, Teil I) sind biologische Systeme wie Zellen gezwungen, präzise an vorgegebene adhäsionsfördernde Ankerpunkte zu binden. Zu diesem Zweck wurde ein spezifisch nanostrukturiertes Hydrogelsystem verwendet, dessen quasi hexagonale Anordnung der Ankerpunkte (Goldpartikel) auf mizellarer Nanolithographie basiert. Diese Partikel können mit sehr gut kontrollierbaren und einstellbaren Abständen generiert werden. Die Übertragung der Goldstruktur auf die Hydrogele und somit das präzise Angebot von Ankerpunkten ermöglicht spezifische Fragestellungen, beispielsweise in Bezug auf die Dichte der EZM-Liganden, welche benötigt wird um Wechselwirkungen und Clusterbildung der Zelloberflächenrezeptoren zu ermöglichen. Durch die präzise Strukturierung können sowohl die Dichte und somit die Konzentrationen, als auch die relativen Positionen bzw. die Abstände der Liganden zueinander kontrolliert werden. Dies kann unterschiedliche Zellantworten auslösen und ist daher von großem Interesse³⁴. Beobachtungen *in vivo*, welche zeigten dass Kollagenfasern in einer räumlichen Periodizität von 67 nm mit Gewebezellen wechselwirken³⁵, verdeutlichen die Wichtigkeit von Modellsystemen mit Nanometerpräzision. Die bereits oben erwähnte Clusterbildung der Transmembranintegrine nimmt eine überlebenswichtige Rolle der Zellen ein. Sie ermöglicht die Ausbildung stabiler Fokalkontakte, welche für das Anhaften der Zellen auf einem Substrat elementar sind. Dabei ist die Clusterbildung auf bestimmte Inter-Integrin Abstände begrenzt. Bei Abständen von 73 nm, sind die Fokalkontakte stark dynamisch und bewirken nur schwache Zellanhaftungen, während bei Abständen von 58 nm, stabile Adhäsionen ausgebildet werden³⁶⁻³⁸. Das in dieser Arbeit entwickelte Hydrogelsystem wird zusätzlich durch eine kovalente Biofunktionalisierung der kreuzvernetzten PEG-Hydrogele direkt erweitert. Diese

kann neben großflächigen Oberflächenfunktionalisierungen der Hydrogele ebenfalls auf Mikrometerskala erfolgen (Kap. 5.3.1, 5.3.2). Im Vergleich zu früher vorgestellten, nanostrukturierten Hydrogelen^{245, 39} und anderen flexiblen Systemen, wie Polyacrylamid⁴⁰ oder Poly(dimethylsiloxan) (PDMS), dessen Elastizitätsmodul in der Größenordnung von 1 MPa liegt und sich lediglich um eine Größenordnung variieren lässt⁴¹, weist das hier präsentierte Hydrogelsystem entscheidende Verbesserungen auf. So bietet es einen Elastizitätsbereich von vier Größenordnungen (von 0,6 kPa bis 6 MPa), stärkere proteinabweisende Eigenschaften, eine bedeutende Verbesserung der Substrathandhabung sowie eine innovative Kombinierbarkeit diverser Parameter. Ein Teil dieser Arbeit beschreibt die Entwicklung eines biofunktionalen Chips mit variablen Parametern, wie Oberflächenelastizität, variierender Dichte der Kontaktpunkte und Möglichkeit der Verwendung unterschiedlicher Funktionalitäten bzw. bioaktiver Moleküle, welche für bestimmte biologische Anwendungen spezifisch gewählt werden können. Mit diesem System wird ein künstliches extrazelluläres Matrixsystem präsentiert, um Zellverhalten unter kontrollierten Bedingungen zu beeinflussen⁴², zu quantifizieren⁴³ und zu visualisieren⁴⁴.

Die Forschung dieser Arbeit unter Anwendung des entwickelten Systems, konzentrierte sich insbesondere auf ein spezielles Zellsystem, den sogenannten *Plasmodium* Sporozoiten. Diese einzelligen Parasiten sind ein Stadium des Erregers der Vektor-Krankheit Malaria und werden durch infizierte Moskitos der Gattung *Anopheles* übertragen. Diese Übertragung der Malariaparasiten durch den Stich der Mücke erfolgt entgegen der teilweise immer noch verbreiteten Meinung von Wissenschaftlern nicht direkt in die Blutbahn, sondern zunächst in Gewebe. Darauf weisen unterschiedliche indirekte Beobachtungen hin. So wurde beispielsweise nach Entfernen von Hautgewebe nach einer Injektion von Sporozoiten bei Mäusen keine Malariainfektion festgestellt²⁶⁴. Diese Tatsache macht das entwickelte, Gewebe-imitierende Hydrogelsystem zu einem höchst interessanten Werkzeug zur

Erforschung des Parasiten. Der *Plasmodium* Parasit durchlebt einen komplexen Lebenszyklus (Kap. 2.6.2), welcher unterschiedliche Stadien sowohl in Wirbeltier-Wirten als auch in den übertragenden Insekten umfasst. Dabei muss er sich verschiedenen extra- und intrazellulären Umgebungen anpassen und mit unterschiedlichen Gewebeformen interagieren. Die Fortbewegung der *Plasmodium* Parasiten zeichnet sich durch einen einzigartigen Mechanismus (den sogenannten Gleitmechanismus) aus, bei welchem sie ihre Form nicht verändern. Diese spezielle Gleitbewegung findet man nur in *Apicomplexa* (Sporentierchen) Parasiten. Ein weiterer Parasit der *Apicomplexa* ist der Erreger (*Toxoplasma*) der Toxoplasmose, welcher zu den häufigsten Blutparasiten in Säugetieren gehört und fatale Folgen für den ungeborenen Fötus haben kann⁴⁵⁻⁴⁷. Eine bessere Kenntnis des molekularen Aufbaus des Bewegungsapparates könnte mögliche Angriffspunkte im Kampf gegen Malaria offenlegen und der Entwicklung von Wirkstoffen dienen, welche die Migration und Adhäsion der Parasiten blockieren und somit eine Infektion verhindern. In den hier durchgeführten Experimenten wurde das Bewegungs- und Adhäsionsverhalten von Sporozoiten der Spezies *Plasmodium berghei*, einer Form der Malaria welche speziell Nagetiere befällt, untersucht. Die Bewegung des *Plasmodium* Sporozoiten basiert auf einer Aktin - Myosin-Motormaschinerie, jedoch sind Aktinfilamente innerhalb des Parasiten bisher nicht visualisierbar. Biochemische Anzeichen suggerieren, dass die Filamente sehr kurz sind und sich schnell umlagern^{253,261}. Interessanterweise sind die Bildung von Adhäsionen und die Adhäsionsrate abhängig von der Aktindynamik²¹⁵. Des Weiteren wird vermutet, dass mehrere Oberflächenproteine in der Bildung von Adhäsionskontakten involviert sind. Über ihre individuelle Rolle bei der Adhäsion, eventuelle kooperative Effekte und ihre zelluläre Lokalisation ist jedoch wenig bekannt^{246,215}. Nähere Zusammenhänge des Adhäsions- und Bewegungsmechanismus wurden hier anhand der oben erläuterten variablen Hydrogelsysteme erstmals experimentell in Hinblick auf Substratelastizität, vorgegebene Abstände der Ankerpunkte und

unterschiedlichen Oberflächenliganden untersucht. Die Studien erfolgten sowohl mit Wildtyp (WT)-Parasiten als auch mit einem Stamm der einen Mangel (-) an TLP (*TRAP Like Protein*) aufweist, von welchem angenommen wird, eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Parasiten zu spielen^{207,216}. Im Weiteren wurden die WT- und TLP(-)-Parasiten auf den verschiedenen Substraten ebenfalls unter Einfluss der Wirkstoffe Cytochalasin D und Jasplakinolid, welche die Polymerisation der Aktinfilamente beeinflussen, untersucht. Aus diesen Experimenten resultierten aufschlussreiche Erkenntnisse über das Adhäsions- und Bewegungsverhalten der *Plasmodium* Sporozoiten, welche zu einem tieferen Verständnis des Gleitmechanismus verhelfen.

2 Kenntnisstand

2.1 Nanotechnologie und Nanobiotechnologie

Der Begriff Nanotechnologie steht für die Bearbeitung und Analyse von Materialien, deren räumliche Ausdehnung unter 100 nm liegt⁴⁸. Im Falle von Nanopartikeln dominieren die Oberflächeneigenschaften gegenüber den Volumeneigenschaften, was zur Folge hat, dass zunehmend quantenmechanische Effekte berücksichtigt werden müssen. Die charakteristischen Eigenschaften vieler Nanostrukturen sind nicht alleine von der Art des Ausgangsmaterials abhängig, sondern werden stark von ihrer Größe und Form geprägt. Diese mechanischen, optischen, magnetischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften macht sich die Nanotechnologie zu Nutze. So werden wir im alltäglichen Leben bereits mit vielen nanotechnologischen Anwendungen konfrontiert, wie Silber-Nanopartikel als desinfizierende Substanz in Kleidung oder Plastikverpackungen. Nanopartikel finden ebenfalls Anwendung in kratzfesten Autolacken, imprägnierenden Substanzen für Stoffe und Oberflächen sowie antireflektierenden Beschichtungen.

Die Kombination von Nano- und Biotechnologie ermöglicht es vielfältige Vorgänge in biologischen Systemen zu analysieren, zu manipulieren und somit zu verstehen. Neben der Erforschung von Strukturen und Vorgängen des Lebens im Nanometer-Maßstab, nutzt die Nanobiotechnologie das gewonnene Wissen auch zunehmend um dieses in technischen Systemen anzuwenden. Die übergreifende Zusammenarbeit von Biologie, Chemie, Physik und Ingenieurwissenschaften führt zu Innovationen in der Medizin und den Lebenswissenschaften. Durch den Einblick in einzelne biologische Prozesse, beispielsweise im Inneren einer Zelle, oder wie in dieser Arbeit in Malaria-Parasiten, eröffnet die Nanotechnologie ebenfalls im medizinischen Sektor neue Möglichkeiten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich durch die Kombination dieser Fachrichtungen zunächst mit materialwissenschaftlichen Aspekten, wie der Entwicklung proteinabweisender, multifunktionaler und nanostrukturierter Polyethylenglykol (PEG) - Hydrogele mit unterschiedlichen Elastizitäten. Diese werden in weiteren Schritten zur Analyse biologischer Systeme genutzt und dienen dabei der Untersuchung des Bewegungsmechanismus von *Plasmodium* Sporoziten (Malariaerregern).

2.2 Mizellare Nanolithographie

2.2.1 Techniken zur Strukturzeugung im Nanometer-Maßstab

Zur Realisierung von Nanostrukturen werden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Der sogenannte *top down (von oben nach unten)*-Ansatz erschließt den Nanometerbereich strukturtechnisch durch die Abwärtsskalierung mikrotechnischer Methoden. So werden durch den Einsatz von Elektronen- und Ionenstrahlolithographischen Prozessen Strukturen im mittleren Nanometerbereich (10-20 nm) erzielt. Die starke wirtschaftliche Förderung aufgrund des technischen Potentials, beispielsweise zur Fertigung höchstintegrierter Festkörperschaltkreise, führte mittlerweile sogar zum Erreichen des oberen Nanometerbereichs. Die Ansätze dieser Techniken basieren auf konventionellen ingenieurwissenschaftlichen und physikalischen Prozessen⁴⁹⁻⁵¹.

Die *bottom up (von unten nach oben)*-Strategie ist dagegen stark durch das konventionelle, chemische Denken geprägt. Sie zielt darauf ab, aus kleinen molekularen Bausteinen, technische Funktionssysteme durch Synthese und Selbstorganisation zu generieren und somit Funktionen auf der Ebene einzelner Moleküle bzw. supermolekularer Komplexe zu realisieren⁵². Zu diesem Ansatz, welcher der molekularen Nanotechnologie entspricht, zählt auch der Übergang von

der klassischen Synthese- und Polymerchemie zur supermolekularen Chemie. Durch das gezielte Zusammensetzen molekularer Bausteine werden komplexe Strukturen mit Abmessungen in mindestens einer Größenordnung unterhalb der minimalen Abmessungen der *top down*-Technik erreicht.

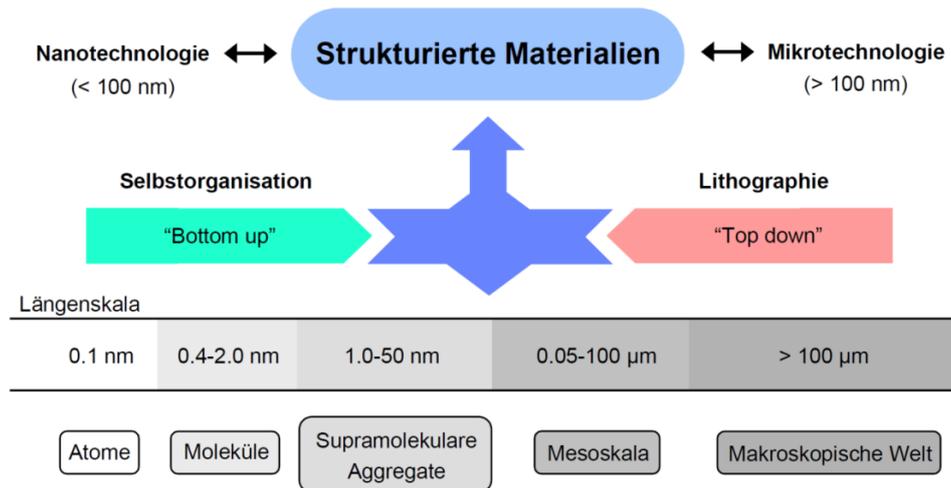


Abbildung 1: Methoden der Strukturierung und deren Abmessungsbereiche.

2.2.2 Grundlagen zu Oberflächeneigenschaften

Eine Fläche, welche zwei Phasen voneinander trennt, wird als sogenannte Grenzfläche bezeichnet. Betrachtet man eine fest-flüssig Grenzfläche, oder ist eine der beiden gasförmig, so stellt diese Grenzschicht eine Oberfläche dar⁵³. Ein Teilchen erfährt im Inneren eines Festkörpers von allen Seiten eine attraktive Kohäsionskraft, welche den Festkörper zusammenhält. Auf ein Teilchen an der Oberfläche wirkt diese Kohäsionskraft jedoch nur von drei Raumrichtungen, somit wird ein Teilchen an der Oberfläche zum Inneren des Körpers gezogen. Die Volumeneigenschaften im Innern unterscheiden sich somit deutlich von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche. In Flüssigkeiten bewirkt dieser Effekt eine Verkleinerung der Oberfläche auf ein Minimum, wodurch eine kugelförmige

Tropfenbildung verursacht wird. Diese Eigenschaft wird durch die sogenannte Oberflächenspannung γ dargestellt, welche bei Festkörpern auch als Oberflächenenergie oder Oberflächenenergiedichte bezeichnet wird. Bringt man nun zwei unterschiedliche Körper in Kontakt (beispielsweise Festkörper auf Festkörper, Flüssigkeit auf Festkörper), treten Adhäsionskräfte auf, die auf einer Wechselwirkung zwischen den Körpern beruhen. Diese kann durch die Grenzflächenenergie γ_{12} (Formel 1) definiert werden und ergibt sich aus der Summe der Oberflächenenergien der beiden Körper im Vakuum (γ_1, γ_2) unter Berücksichtigung der Arbeit, die verrichtet wird um beide Körper in Kontakt zu bringen (W_{12}).

$$\text{Grenzflächenenergie } \gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - W_{12} \qquad [\gamma] = \text{Jm}^{-2} = \text{Nm}^{-1} \qquad \text{Formel 1}$$

Die Verringerung der Oberflächenenergie ist Grundlage für die Bildung von Molekülschichten⁵³. So führt beispielsweise der große Unterschied der Oberflächenenergie organischer Verbindungen zur Adsorption auf Metall - oder Oxidoberflächen (1000-5000 mJ/m²).

2.2.3 Amphiphile Diblock Copolymere

Makromoleküle, welche aus zwei Blöcken oder Sequenzen (Block A und Block B) chemisch unterschiedlicher Wiederholungseinheiten bestehen, werden als Diblockcopolymere bezeichnet. Hierbei sind beide Blöcke durch eine kovalente Bindung miteinander verknüpft. Diblockcopolymere weisen ein hohes Molekulargewicht und eine definierte Anzahl der einzelnen Blöcke auf. Ihre Synthese wurde mittels „lebender“ anionischer Polymerisation ermöglicht⁵⁴. Da die

„lebende“ Polymerisation keine Abbruchs- oder Übertragungsreaktionen aufweist, bleiben die aktiven Kettenträger mit einer individuellen Polymerkette verbunden. Dies resultiert in Polymerketten mit idealer Molekulargewichtsverteilung $M_w/M_n < 1:1$ (M_w = mittleres Molekulargewicht, M_n = Zahlenmittel der Molmasse). Der Beendigung der Polymerisation folgt eine Addition des zweiten Monomers an das aktive Ende. Nach Anwachsen des zweiten Blocks wird die Reaktion durch ein Abbruchreagenz terminiert, woraus wohldefinierte Blockcopolymere resultieren⁵⁵. Da die Grundbausteine der Polymerblöcke meist thermodynamisch inkompatibel sind, besteht eine sogenannte Entmischungstendenz (Mikrophasenseparation). Das Phasenverhalten der Blockcopolymere sowohl in Lösung als auch im festen Zustand ist durch ihre chemische Struktur geprägt⁵⁶. Dieses Phasenverhalten wird durch verschiedene Parameter bestimmt, wie den Gesamtpolymerisationsgrad N des Blockcopolymers, die Volumenbrüche der Einzelkomponenten $f_A, f_B = 1-f_A$ und dem Flory-Huggins-Segmentwechselwirkungsparameter χ_{AB} , welcher den Grad der Unverträglichkeit definiert. Betrachtet man das Produkt (χN) aus Segmentwechselwirkungsparameter χ_{AB} und dem Gesamtpolymerisationsgrad N , ergibt sich folgendes Phasenverhalten des Blockcopolymers: Für $(\chi N) \ll 1$ wird die Bildung einer isotropen, ungeordneten Schmelze generiert. Hierbei wird das Mischen der Komponenten aufgrund der Dominanz entropischer Effekte begünstigt (*weak segregation regime*). Durch Änderung des Molekulargewichts oder des Segmentwechselwirkungsparameters χ_{AB} (Temperaturerniedrigung) und der damit verbundenen Erhöhung des Produkts (χN) , kommt es oberhalb eines kritischen Wertes $(\chi N)_c$ zur Mikrophasenseparation [$(\chi N) \gg 10,5$]^{57, 58} (*strong segregation regime*). Abbildung 2 stellt die Gleichgewichtsmorphologien im *strong segregation regime* in Abhängigkeit des Volumenanteils f_A der Komponente A dar. Für kleine Werte von f_A treten kubisch raumzentrierte Gitter auf, bei größerem f_A werden daraus Zylinder, welche auf einem hexagonalen Gitter angeordnet sind. Symmetrische

Diblockcopolymeren mit $f_A = 0,5$ zeigen eine lamellare Schichtstruktur. Neben diesen Strukturen treten ebenfalls noch bikontinuierliche Gyroidphasen sowie Doppeldiamant-Strukturen auf^{59,60}.

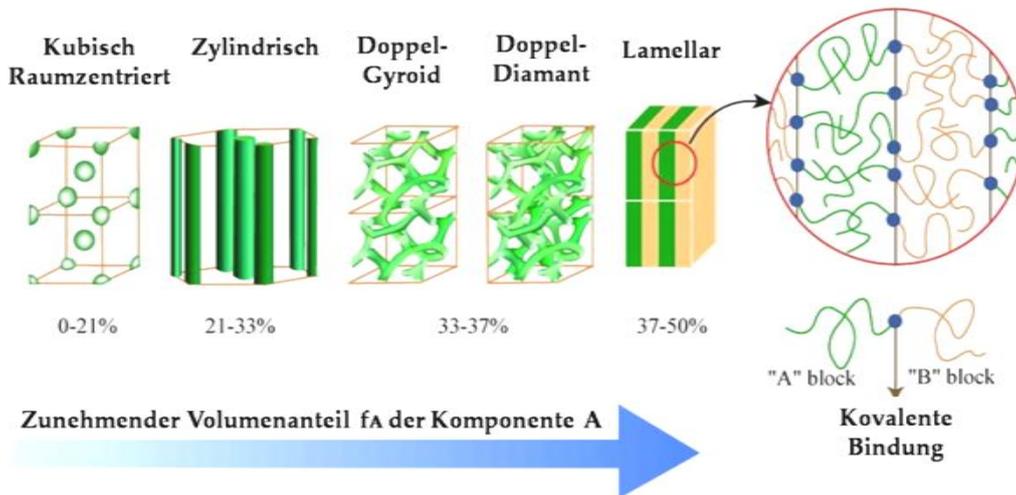


Abbildung 2: Gleichgewichtsmorphologien in $(A_n)-(B_m)$ Diblockcopolymeren mit zunehmendem Volumenanteil f_a der Komponente A.

Die in dieser Arbeit verwendeten amphiphilen Diblockcopolymeren setzen sich aus einem unpolaren Polystyrol (PS)- und einem polaren Poly(2-vinylpyridin) (P2VP)-Block zusammen (Abbildung 3).

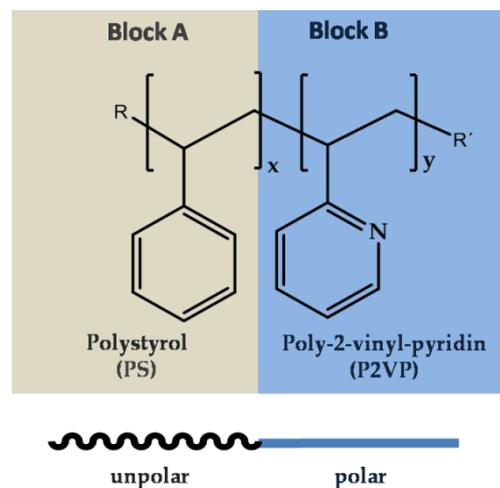


Abbildung 3: Chemische Zusammensetzung des amphiphilen Polystyrol-*b*-Poly(2-vinylpyridin) (PS-*b*-P2VP) Diblockcopolymeren.

2.2.4 Bildung von Mizellen

Aufgrund ihrer Polarität bilden Diblockcopolymere in unpolaren Lösungsmitteln inverse Mizellen aus. Hierbei befinden sich die unpolaren Blöcke außen und schirmen den polaren Kern ab, wodurch thermodynamisch ungünstige Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel minimiert werden. Die Bildung der Mizellen wird durch zwei Faktoren bestimmt. Die Unverträglichkeit ungleicher Blöcke führt zur Assoziation gleicher Blöcke, wobei ein unbegrenztes Zusammenwachsen durch sterische Effekte verhindert wird⁶¹.

Die Ausbildung der Mizellen zeigt eine starke Abhängigkeit bezüglich der Konzentration des Diblockcopolymers. So liegen die Blockcopolymer-Ketten unterhalb einer sogenannten kritischen Mizellkonzentration (CMC, *critical micellar concentration*) vereinzelt in Lösung vor. Ab der kritischen Mizellkonzentration bilden sich Mizellen aus, deren Polymerketten im dynamischen Gleichgewicht mit den freien Ketten in Lösung stehen^{62,63} (Abbildung 4). Konzentrationen weit über der CMC bewirken eine Verringerung des Durchmessers der Mizellen. Der Durchmesser der Mizellen kann generell über das Molekulargewicht des Diblockcopolymers, sowie durch Polymer-Polymer- und Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungen beeinflusst werden⁶⁴.

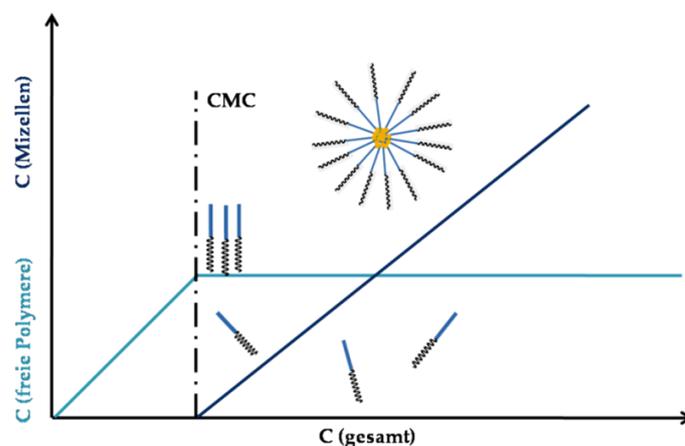


Abbildung 4: Kritische Mizellkonzentration (CMC). Die Bildung von Mizellen in Abhängigkeit der Konzentration des Diblockcopolymers.

2.2.5 Mizellen als chemische Nanoreaktoren

Die Bipolarität der hier verwendeten Polystyrol-*b*-Poly(2-vinylpyridin) (PS-*b*-P2VP) Mizellen ermöglicht deren Funktion als Nanoreaktoren. Dabei wird eine Beladung mit anorganischen Metallkomplexen, wie HAuCl_4 , H_2PtCl_6 , ZnCl_2 oder AgOAc ermöglicht, welche durch eine Säure-Base-Reaktion zwischen dem entsprechenden Salz und dem basischen P2VP-Kern der Mizelle erfolgt^{65,66} (Abbildung 5). In dieser Arbeit wurde ausschließlich HAuCl_4 zur Beladung der Mizellen verwendet.

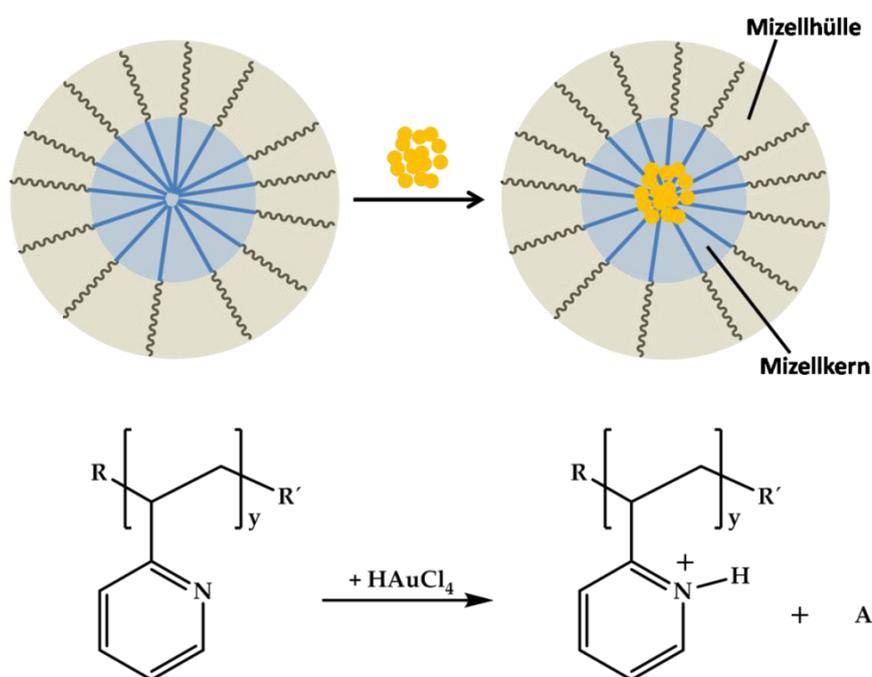


Abbildung 5: Mizellen als chemische Nanoreaktoren. Beladung des Mizellkerns mit Goldsäure (HAuCl_4).

Durch die Komplexbildung, der als Gegenion verbleibenden Tetrachloroaurationen mit den protonierten 2VP Einheiten, wird die energetisch ungünstige Wechselwirkung zwischen polarem, beladenem Kern und unpolarem Lösungsmittel noch verstärkt. Dies bewirkt eine Stabilisierung der Mizellen, wodurch es zu einer Herabsetzung der kritischen Mizellkonzentration (CMC) kommt⁶⁷.

Die Beladung L des Kerns wird durch das Verhältnis Anzahl (n) der neutralisierten (mit Tetrachlorgoldsäure) 2-Vinylpyridineinheiten zur Gesamtzahl (m) der 2-Vinylpyridineinheiten dargestellt.

$$L = n(\text{HAuCl}_4)2VP / m(2VP) \quad \text{Formel 2}$$

So ergibt sich beispielsweise bei einer Beladung L von 0,5 eine statistische Beladung jeder zweiten 2-Vinylpyridineinheit des Diblockcopolymers mit einem Tetrachlorgoldsäurekomplex. Mit zunehmender Beladung vergrößert sich somit der Durchmesser der generierten Goldpartikel.

2.2.6 Strukturbildung auf Substratoberflächen

Zur Beschichtung von Substratoberflächen sind unterschiedliche Techniken bekannt. Eine gängige Methode, insbesondere in industriellen Verfahren, ist beispielsweise das sogenannte Aufschleuderverfahren (*spin-coating*). Hierbei werden flache Substrate in einer Rotationsbeschichtungsmaschine fixiert. Anschließend wird die Beschichtungslösung auf die Substrate aufgetropft, welche durch Zentrifugalkräfte gleichmäßig als dünne Schicht auf dem Substrat verteilt wird. Die Schichtdicke lässt sich über die Rotationsgeschwindigkeit justieren⁶⁸.

Eine weitere Methode ist das Tauchbeschichtungsverfahren (*dip-coating*), welches in dieser Arbeit zur Beschichtung der Glassubstrate verwendet wurde. Bei diesem Verfahren werden die Substrate in die Beschichtungslösung getaucht und mit einer bestimmten und konstanten Geschwindigkeit wieder herausgezogen⁶⁹. Hierbei werden die feinen Partikel einer Suspension gleichmäßig in einer geordneten Partikelmonolage auf dem Substrat verteilt^{70, 71}. Die Bildung quasi-hexagonal

geordneter Monolagen durch das Tauchbeschichtungsverfahren basiert auf zwei Prinzipien und wird durch den sogenannten Konvektionsfluss, sowie durch laterale Kapillarkräfte während des Trocknens des Lösungsmittelfilms bestimmt. Zum einen werden die Partikel durch konvektiven Fluss bei der Evaporation des Lösungsmittels während des Herausziehens des Substrates aus der Hauptlösung bewegt und ordnen sich dabei auf der Oberfläche, zum anderen kommt es durch attraktive, laterale Kapillarkräfte zwischen den Partikeln in Lösung zur Bildung einer geordneten Phase⁷¹. Aufgrund der Veränderung des Flüssigkeitsspiegels zwischen zwei Partikeln beim Trocknen des Films, werden die Partikel zusammengezogen. Bei der Strukturierung der Substrate durch die Beschichtung mittels der mit Tetrachloroaurationen beladenen Mizellen wird dieses Verhalten ebenfalls beobachtet und resultiert einer quasi-hexagonalen Ordnung (Abbildung 6).

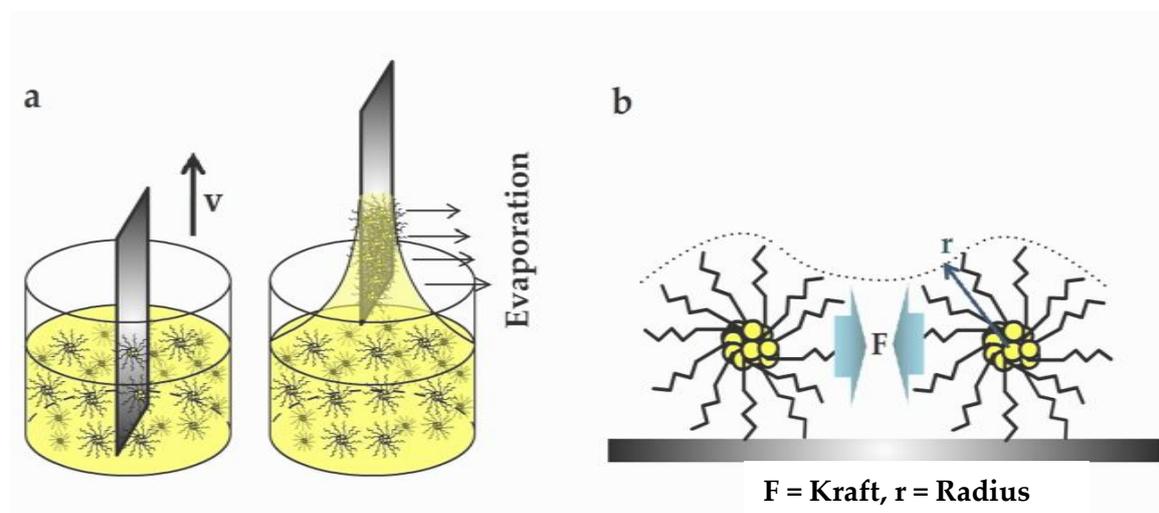


Abbildung 6: Tauchbeschichtungsvorgang und dabei auftretende Kräfte. a) Konvektionsfluss aufgrund des Herausziehens. b) Kapillarwechselwirkung zwischen sphärischen Mizellen.

Die elastischen Eigenschaften der Mizellen aufgrund ihrer flexiblen Hüllen im Vergleich zu harten Partikeln ermöglichen ein Abflachen auf dem Substrat und somit

eine homogene und geordnete Bedeckung für unterschiedliche mizellare Konzentrationen. So kommt es auch bei hohen Konzentrationen, bei denen die Mizellen komprimiert vorliegen, zu einer hexagonalen Anordnung. Ebenso wird diese Anordnung noch bei niedrigen Konzentrationen, bei welchen die Mizellen gestreckt und horizontal verformt sind, beobachtet⁶⁷. Nicht deformierbare Partikel scheiden sich in einem solchen Fall als unregelmäßige Doppellagen beziehungsweise in geordneten Inselformationen ab⁷¹.

Die Behandlung des monomizellaren, geordneten Films auf der Substratoberfläche mit einem reaktiven Plasma resultiert in der Bildung der strukturierten Goldpartikel in Nanometerdimension. Dabei werden durch den Plasmaprozess die organischen Mizellreste entfernt, sowie die Tetrachloroaurationen zu elementarem Gold reduziert, ohne die Position der Partikel auf der Substratoberfläche zu beeinflussen (Abbildung 7).

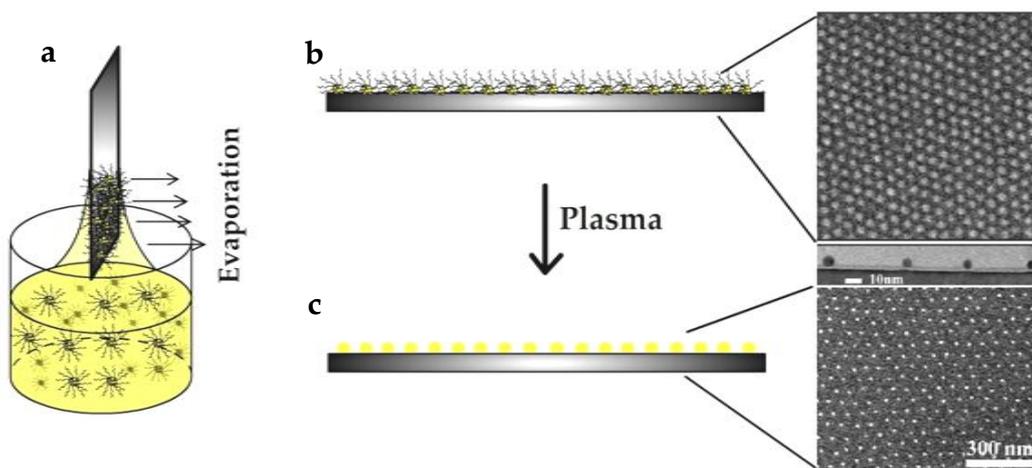


Abbildung 7: Schematische Übersicht zur Strukturbildung der Goldnanopartikel auf Substratoberflächen. a) stellt den Tauchbeschichtungsprozess zur Abscheidung des Mizellfilms dar. b) zeigt die Bildung des mizellaren Films auf der Substratoberfläche. c) Eine anschließende Plasmabehandlung bewirkt die Reduktion zu elementarem Gold sowie eine Entfernung der organischen Polymerreste. Auf der rechten Seite sind entsprechende rasterelektronenmikroskopische

(REM) Aufnahmen sowie eine transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmeⁱ von Gold-Nanopartikeln auf einem Silizium-Wafer abgebildet.

Da sich das hier beschriebene Verfahren der Strukturgenerierung auf Oberflächen, insbesondere aufgrund des Plasmaprozesses, nur für anorganische Oberflächen eignet, ist für die Strukturierung der in dieser Arbeit verwendeten PEG-Hydrogele ein spezielles Übertragungssystem erforderlich (Kap. 4.1.7, 4.1.9).

2.2.7 Faktoren zur Bestimmung der Partikelabstände

In der Diblockcopolymer-Mizell-Nanolithographie lassen sich die Partikelabstände hauptsächlich durch drei Faktoren beeinflussen: den Mizelldurchmesser bzw. Radius, die Mizellkonzentration sowie durch das Volumen der Mizelllösung auf der Substratoberfläche (Dicke des Mizellfilms).

I) Mizellradius

Der Abstand der Goldpartikel ist am stärksten durch den Einsatz verschiedener Molekulargewichte der Diblockcopolymerer variierbar. Längere Polymerketten haben einen größeren Mizellradius zur Folge, was bei sonst konstanten Bedingungen wiederum in einem größeren Abstand resultiert. Der Radius einer trockenen Mizelle erschließt sich wie folgt:

$$M_{\text{Mizelle}} = \frac{Z \cdot M_w}{N_A} = \rho_{\text{Mizelle}} \frac{4}{3} \pi \cdot R^3 \quad \text{Formel 3}$$

ⁱ Die Seitenansicht der Goldstruktur mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurde von Dr. Banhart, Universität Ulm durchgeführt.

Dabei ist M_{Mizelle} das Gewicht einer einzelnen Mizelle, Z die Anzahl der Polymerketten pro Mizelle (Aggregationszahl), M_w das Molekulargewicht des Polymers und N_A die Avogadro Konstante. Ist die Mizelldichte ρ_{Mizelle} gleich der Polymerdichte, lässt sich die Größe für eine gegebene Aggregationszahl näherungsweise bestimmen⁶⁷.

II) Mizellkonzentration

Ein weiterer Parameter zur Regulation der Partikelabstände ist die Mizellkonzentration. Diese gibt vor, wie dicht gepackt die Mizellen vorliegen und lässt sich über die Menge des gelösten Diblockcopolymers einstellen. Dabei bewirken höhere Konzentrationen kleinere Abstände, da in diesem Fall die Mizellen dichter gepackt sind. Dies ist möglich, da die Mizellen, wie bereits in Kap. 2.2.6 beschrieben, kompressibel sind.

III) Schichtdicke des Mizellfilms

Durch die Veränderung der Schichtdicke des mizellaren Films und der damit zusammenhängenden Anzahl der Mizellen pro Fläche, lässt sich der Abstand der Goldpartikel unter Verwendung einer einzigen Lösung stark variieren⁷². Die Dicke des Films wird durch die Viskosität und Kapillarität bestimmt, welche entgegengesetzt zueinander wirken. Abbildung 8 veranschaulicht den Meniskus, welcher beim Herausziehen eines Substrates aus einer Newtonschen Lösung entsteht. Im unbewegten Zustand des Substrats entspricht der Meniskus der blau gestrichelten Linie. Er entsteht, wenn die Adhäsion größer als die Kohäsion innerhalb der Flüssigkeit ist. Der resultierende Meniskus eines Substrats, welches aus der Lösung herausgezogen wird, ist durch die schwarze Linie dargestellt. Wird das Substrat langsam aus der Flüssigkeit gezogen, ist der Flüssigkeitsfilm entsprechend dünn, da die Flüssigkeit in diesem Fall nicht durch das Substrat mitgezogen wird. Aufgrund der gegebenen Viskosität der Flüssigkeit bewegt sich diese mit der

gleichen Geschwindigkeit wie das Substrat⁷³. Mit zunehmender Zuggeschwindigkeit erhöht sich somit die Dicke des Flüssigkeitsfilms.

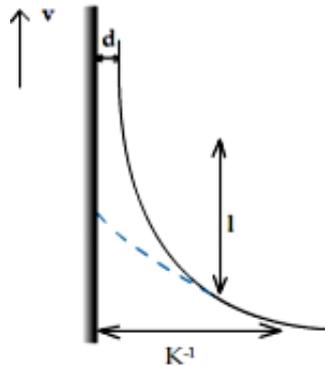


Abbildung 8: Darstellung der Meniskenbildung im Falle eines unbewegten (blau gestrichelte Linie) und bewegten (schwarze durchgezogene Linie) Substrats.

Das Verhältnis von Viskositätskräften zu Oberflächenspannungen an Flüssig-Gas-Phasengrenzen oder unmischbaren Flüssigkeiten wird durch die sogenannte Kapillarzahl Ca wiedergegeben. Diese ist eine dimensionslose Kennzahl und ist definiert durch:

$$Ca = \frac{\eta V}{\sigma} \quad \text{Formel 4}$$

wobei η die dynamische Viskosität der Flüssigkeit [Pa·s], V die charakteristische Geschwindigkeit [m/s] und σ die Oberflächenspannung [N/m] darstellen.

Die maximale Höhe der Filmschicht h_∞ einer Newtonschen Flüssigkeit in Abhängigkeit der Kapillarzahl Ca wurde erstmals durch Landau, Derjaguin und Levich (LLD) wie folgt dargestellt^{69,74}:

$$\begin{aligned} h_\infty &= 0.94 \cdot \kappa^{-1} \cdot Ca^{2/3} && \text{Formel 5} \\ &= 0.94 \sqrt{\frac{\sigma}{\rho g}} \cdot Ca^{2/3} \end{aligned}$$

$$= 0.94 \frac{(\eta V)^{\frac{2}{3}}}{(\rho g)^{\frac{1}{2}} \sigma^{\frac{1}{6}}}$$

Dabei ist κ^{-1} die Kapillarlänge, wie in Abbildung 8 dargestellt, g die Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$) und Ca die Kapillarzah (Formel 4). Dieser Zusammenhang ist nur für kleine Kapillarzahlen ($Ca \ll 1$) gültig, was für das hier vorgestellte System angenommen werden kann⁷⁵. Die Filmdicke und somit auch die Anzahl der Mizellen pro Fläche werden demnach stark durch die Viskosität der Polymerlösung und die Zuggeschwindigkeit ($h_{\infty} \sim V^{\frac{2}{3}}$, $h_{\infty} \sim \eta^{\frac{2}{3}}$, Formel 5) bestimmt.

Dieser Zusammenhang zwischen Filmdicke und Zuggeschwindigkeit während des Strukturierungsprozesses spielt nicht nur eine entscheidende Rolle für die Justierung der Partikelabstände sondern beeinflusst insbesondere das Strukturierungsverhalten gekrümmter Oberflächen (in dieser Arbeit Glasfasern mit Durchmessern von 10-120 μm).

2.2.8 Ordnungsparameter

Die Deposition der Gold-Nanopartikel durch mizellare Nanolithographie auf Glasoberflächen erfolgt in einer quasi hexagonalen Anordnung. Um die Ordnung dieses Musters auf der Oberfläche zu charakterisieren wurde eine quantitative Beschreibung der Qualität des Musters eingeführt. Zu diesem Zweck wurde ein entsprechender Algorithmus als Plug-in für ImageJⁱⁱ geschrieben, welcher die Analyse der Rasterelektronenaufnahmen ermöglicht. Das Prinzip der Analyse wird im Folgenden erläutert.

ⁱⁱ Dieser Quellcode wurde durch Dr. Philippe Girard verfasst.

Die zweidimensionale, quasi hexagonale Anordnung der Goldpartikel bzw. der Mizellen kann mit einer Kristallgitterstruktur verglichen werden. Die Definition eines kristallinen Feststoffes erfolgt durch zwei Formen der Ordnung, die translatorische und die orientierte Ordnung. Unter einer translatorischen Ordnung versteht man, dass sämtliche Partikel in einem definierten Bereich über eine große Distanz gleiche Abstände zu ihren Nachbarpartikeln besitzen. Dies wird durch eine radiale Verteilungsfunktion $g(r)$ überprüft, welche die gemittelte Packungsdichte als Funktion der Radialdistanz r ausgehend vom Zentrum des Partikels beschreibt. Die orientierte Ordnung dagegen beschreibt zwei Partikel, die über eine große Distanz voneinander getrennt sind. Betrachtet man diese, so sind ihre Nachbarpartikel relativ zu bestimmten Achsen in gleicher Weise orientiert. In Flüssigkeiten dagegen tritt keinerlei Fernordnung auf. Kosterlitz, Thouless, Halperin, Nelson und Young (KTHNY) beschrieben die Theorie der Abnahme der Ordnung in einem festen Kristall beim Schmelzen⁷⁶. Sie stellten die sogenannte hexatische Phase zwischen Festkörpern und isotropen Flüssigkeiten in zweidimensionalen Systemen vor. Diese Zwischenphase verhält sich bei Rotationsscherungen wie ein Kristall, reagiert jedoch auf lineare Scherkräfte wie eine Flüssigkeit. Hier besitzen die Partikel lediglich eine translatorische Nahordnung, während sie keine orientierte Fernordnung aufweisen. Erklärt wird dies durch eine Störung der kristallinen Ordnung aufgrund von fundamentalen topologischen Defekten, welche als Dislokation (Luxation) und Disklination bezeichnet werden^{76,77}. Diese Defekte beeinflussen die Fernordnung in unterschiedlicher Weise und zerstören somit die geometrischen Eigenschaften des Kristallgitters. Die Dislokationspaare treten nahe der Schmelztemperatur im Kristallgitter auf und verzerren dieses lokal. So besitzen beispielsweise vier Partikel nicht die üblichen sechs Nachbarpartikel, sondern je zwei haben fünf oder auch sieben Nachbarpartikel und bilden somit ein 5/7 Paar. Im hexagonalen Gitter kann eine Dislokation grundsätzlich sechs verschiedene Orientierungen besitzen. Disklinationen entstehen wenn genügend thermische Energie vorhanden ist um ein

5/7 Paar in eine fünfer und siebener Dislokation räumlich zu separieren⁷⁸. Formel 6 stellt einen Ordnungsparameter vor, mit dessen Hilfe die translatorische Ordnung einer Partikelanordnung beschrieben werden kann⁷⁸.

$$\Psi_{\vec{G}}(\vec{r}) = \exp(i\vec{G} \cdot \vec{r}) \quad \text{Formel 6}$$

Dabei entspricht \vec{G} dem reziproken Gittervektor der Anordnung. Sowohl im Falle der Dislokation als auch der Disklination bewegt sich der Ordnungsparameter $\Psi_{\vec{G}}(\vec{r})$ gegen Null. Da die Disklination zusätzlich die lokale Orientierung der Verbindung zwischen den nächsten Nachbarn in einem hexagonal geordneten zweidimensionalen Kristall beeinflusst, wird zur Quantifizierung dieser lokalen Orientierungsordnung ein ergänzender Ordnungsparameter $\Psi_6(r_j)$ eingeführt (Formel 7)⁷⁸.

$$\Psi_6(r_j) = \frac{1}{N_j} \sum_{k=1}^{N_j} \exp(i6\theta_{jk}) \quad \text{Formel 7}$$

θ_{jk} ist hierbei der Winkel, welcher durch die Verbindungen zwischen j und k in Bezug auf eine Referenzachse r_j gebildet wird. N_j repräsentiert die Gesamtzahl der Nanopartikel, durch welche die lokale Ordnung bestimmt wird.

Basierend auf dieser Theorie von KTHNY wurde die Berechnung des Ordnungsparameters der in dieser Arbeit verwendeten hexagonalen Anordnung der Gold-Nanopartikel durchgeführt. Der Durchschnitt der Ordnungsparameter aller hexagonal orientierten Partikel in einem Bild wurde mittels Formel 8 ermittelt.

$$\Psi_6(r_j) = \frac{1}{N(t)} \sum_{j=1}^{N(t)} \sum_{k=1}^{N_j} \exp(i6\theta_{jk}) \quad \text{Formel 8}$$

N_t steht für alle Partikel in einem Bild ($t = 1$). Eine perfekte Ordnung wird durch $\Psi_6 = 1$ dargestellt, $0 < \Psi_6 < 1$ umfasst den Grad der Unordnung und $\Psi_6 = 0$ bedeutet völlige Unordnung. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Substrate mit einem Ordnungsparameter mit mindestens $\Psi_6 \geq 0.5$ verwendet.

2.3 Funktionalisierung von Oberflächen

2.3.1 Selbstorganisierte Monolagen

Die Oberflächenwissenschaften befassen sich zunehmend mit der Erforschung biologischer Systeme auf organischen Adsorbatsystemen. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang in Selbstorganisation erzeugte Monolagen (*self assembled monolayers*- SAMs)⁷⁹. Hierbei handelt es sich um geordnete Schichten organischer Moleküle auf Festkörperoberflächen. Der Selbstordnungsprozess der SAMs erfolgt aufgrund thermodynamischer Gesetze und resultiert im Idealfall im Energieminimum des Systems⁸⁰. Häufige Verwendung finden insbesondere Alkyl-, Arylthiole, Organosilane sowie Fettsäuren und Alkylamine auf Metallen wie Gold, Silber, Kupfer, Platin, Quecksilber und Silizium. Die meist kovalenten Bindungen verleihen dem Adsorbat eine hohe Stabilität⁷⁹⁻⁸¹. Eine weitere Stabilisierung der Monolagen und insbesondere eine hohe innere Ordnung wird durch van-der Waals-Kräfte zwischen längeren Alkylketten (Spacer) induziert. Durch die adsorbierten Moleküle können die makroskopischen Eigenschaften (Oberflächenenergie, Reaktivität, Hydrophobie oder Hydrophilie) der Substratoberfläche in vielfältiger Weise beeinflusst werden. So lassen sich durch die Wahl spezifischer funktioneller Endgruppen modifizierte Monolagen mit charakteristischen chemischen, physikalischen oder auch biologischen Eigenschaften herstellen⁸². Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung der Einheiten der zur Ausbildung von SAMs verwendeten Moleküle.

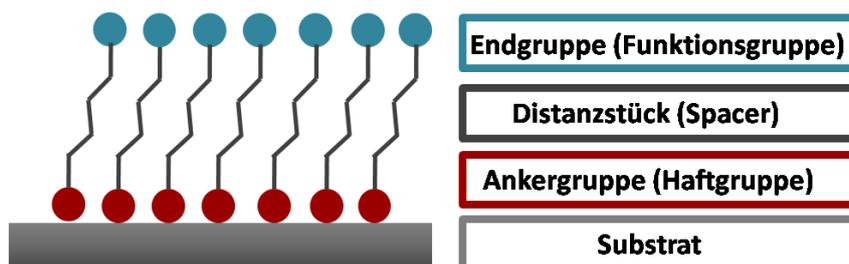


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer selbstorganisierten Monolage.

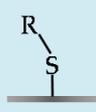
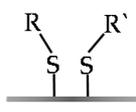
Im Allgemeinen können SAMs sowohl durch Deposition aus Lösungen, als auch aus der Gasphase generiert werden. Die Sättigungsbedeckung der Oberfläche wird bereits nach wenigen Minuten erreicht, wobei in der nachfolgenden Zeit von ein bis mehreren Stunden der Selbstordnungsprozess abläuft⁸³. Dieser Selbstordnungsprozess terminiert sich bei Erreichen der thermodynamisch günstigsten Struktur selbst. Längere Präparationszeiten sind somit meist nicht von Nachteil.

2.3.2 Monolagen von Thiolen auf Gold

Aufgrund der relativen Inertheit und wohldefinierten Oberfläche von Gold und die damit verbundene erleichterte Präparation, gehören Monolagen von Thiolen auf Gold zu den am häufigsten untersuchten funktionalisierten Oberflächen⁷⁹. Die hohe Affinität von Schwefelverbindungen zu Gold ermöglicht den Einsatz einer Vielzahl schwefelhaltiger funktioneller Gruppen, wie Alkanthiole^{81, 84}, Dialkylsulfide (Thioether)⁸⁵, Dialkyldisulfide⁸⁶, Thioacetete⁸⁷, Thiocyanate⁸⁸ und Dialkylthiocarbamate⁸¹. Die Bindungsenergie der Gold-Schwefelbindung liegt zwischen 120-180 kJ/mol⁸⁹. Die Chemisorption eines Thiols an Au(III) ist formal eine oxidative Addition an Au⁰, wodurch es zur Bildung eines Au^I-Thiolats kommt⁸¹. Es folgt eine reduktive Eliminierung von Wasserstoff, wobei dieser Reaktionsverlauf bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte⁸¹. Generell lässt sich sagen, dass Thioether

aufgrund ihrer relativ schwachen Schwefel-Gold-Bindung vergleichsweise nur SAMs mit geringerer Qualität erzeugen, während Thiole und Disulfide ein sehr gutes Ordnungsverhalten aufzeigen.

Tabelle 1: Schwefelhaltige Ankergruppen zur Bindung auf Goldoberflächen.

Funktionelle Gruppe	Strukturformel	Bindungsmuster auf Au-Oberfläche
Thiol Thioacetat Thiocyanat	R-SH R-S(C=O)CH ₃ R-SCN	
Dialkyldisulfid	R-S-S-R'	
Thioether	R-S-R'	

Die Filmbildung findet in zwei Schritten statt. Zunächst erfolgt innerhalb weniger Minuten eine schnelle Adsorption mit einem Bedeckungsgrad von 80-90 %. Die Kinetik dieses Verlaufs ist hierbei von der Konzentration des Thiols abhängig. Genauere Untersuchungen hierzu können beispielsweise mit Kontaktwinkelmessungen und Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS = *X-ray photoelectronic spectroscopy*) durchgeführt werden. Ein ebenfalls entscheidender Faktor für die Dynamik der Anbindung ist die Kettenlänge. So nimmt die Geschwindigkeit des ersten schnellen Adsorptionsschrittes mit wachsender Kettenlänge ab; die vollständige Bedeckung der Oberfläche erfolgt jedoch schneller als mit kurzkettigen Thiolen⁸³. Dieser Maximalwert der Oberflächenbedeckung wird im zweiten Schritt erreicht und kann bis zu mehreren Stunden dauern⁸¹. Es folgt ein geordneter Zustand der durch van-der-Waals-Kräfte zwischen den Ketten sowie elektrostatischer Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken zwischen funktionellen Kopfgruppen generiert wird⁸¹. Die Adsorption der Organothiole erfolgt in einem durch den Platzbedarf der Ketten bedingten Minimalabstand. Dieser Abstand ist in

der Regel größer als der innerhalb des entsprechenden organischen Kristalls, was ein Kippen der Ketten um 30° zur Oberflächennormalen verursacht und somit eine adäquate Packungsdichte der Moleküle, sowie sp^3 -Hybridisierung des Schwefels (Abbildung 10) ermöglicht⁹⁰⁻⁹².

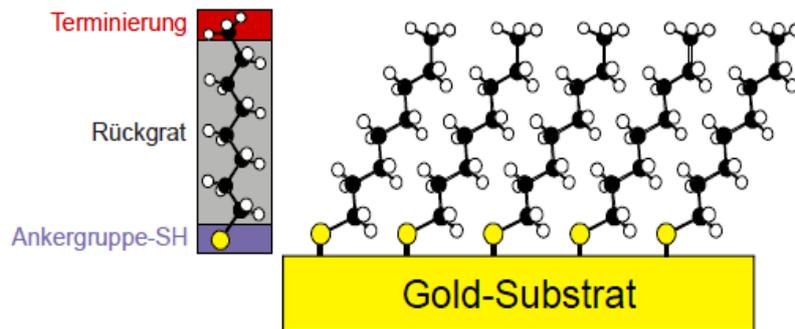


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Organothiolat-SAMs am Beispiel des Oktanthiols⁹³.

Abbildung 11 zeigt die Verbindungen, welche in dieser Arbeit zur Funktionalisierung der Gold-Nanopartikel verwendet wurden.

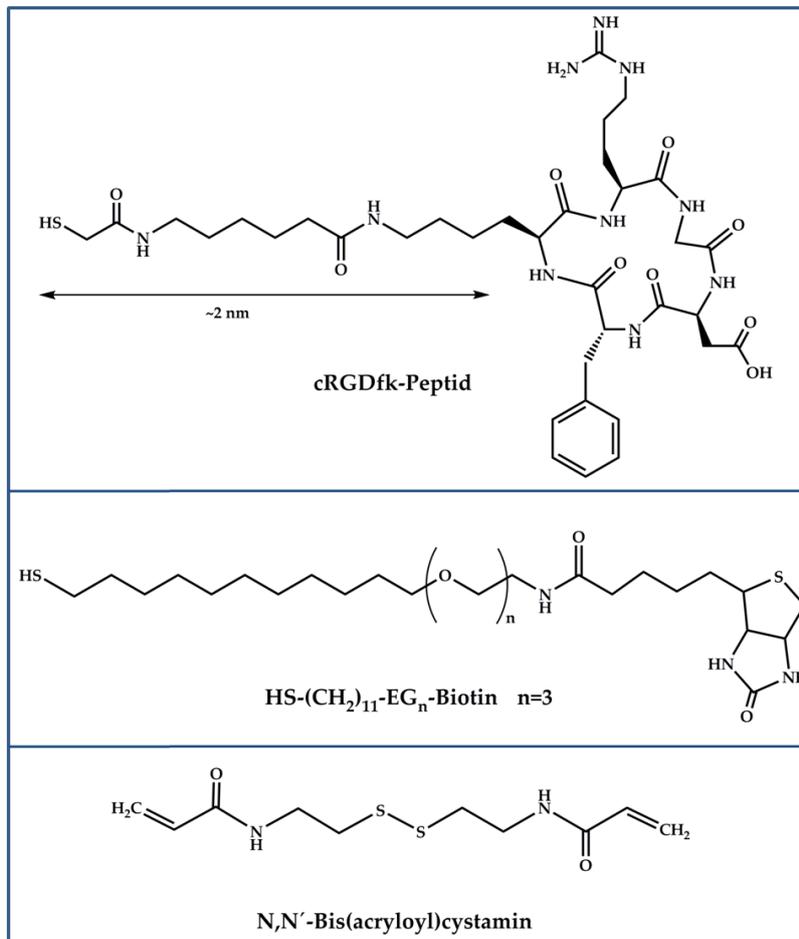


Abbildung 11: Zeigt die in dieser Arbeit zur Funktionalisierung der Goldpartikel verwendeten Thiol-Ankerverbindungen. Die zyklische RGD-Sequenz wurde zur Adhäsionsvermittlung von Zellen an definierte Goldpartikel gebunden (oben). Das thiolierte Biotin wurde an Goldnanostrukturen gebunden, um anschließend fluoreszenzmarkiertes Streptavidin zu koppeln (mitte). N, N'-Bis(acryloyl)cystamin wurde als Linker an die Goldpartikel gebunden und diente somit zur anschließenden Übertragung der Struktur auf Hydrogele.

2.3.3 Silanisierung von hydroxyterminierten Substraten

Neben Thiolen dienen ebenfalls Silanderivate als typische Adsorbatmoleküle. Diese werden mittels Chlorsilyl- oder Alkoxysilyl-Ankern auf der Trägeroberfläche fixiert. Die Kopfgruppe wird meist durch verschiedene chemische Funktionalitäten (ω -Funktionalität) wie Phenyl-, Allyl-, Epoxy-, Amino-, Ester- oder Ammoniumgruppen gebildet, welche hauptsächlich für die Oberflächeneigenschaften der resultierenden

Schicht verantwortlich sind⁹⁴. Getrennt werden Anker –und Kopfgruppe durch einen Spacer, der in der Regel aus einer Alkylkette besteht (Abbildung 12).

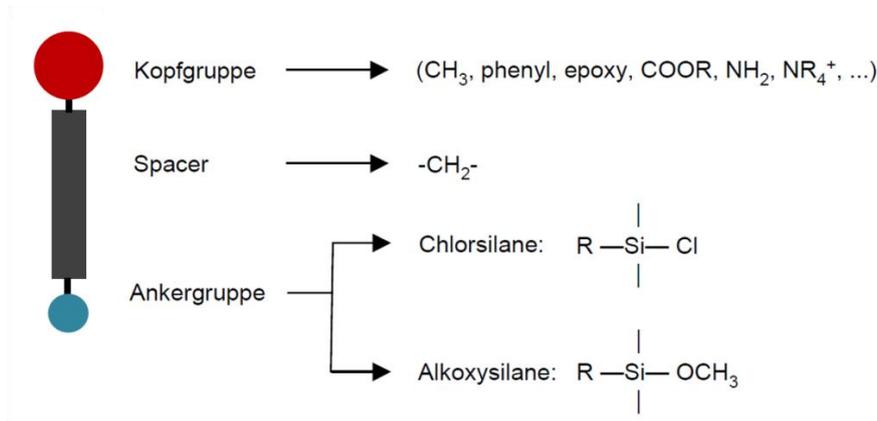


Abbildung 12: Schematischer Aufbau von Silanen als Adsorbatmoleküle.

Die Bildung von Silanfilmen auf hydroxylierten Oberflächen kann im Allgemeinen in drei Schritte unterteilt werden (Abbildung 13). Hierbei hydrolysieren diese zunächst zu den entsprechenden Silanolen (1≡Prozess in Lösung). Diese scheiden sich auf der aktivierten Oberfläche ab (2) und können hier kovalente Bindungen ausbilden (3≡Kondensationsreaktion von bereits physisorbierten Silanolen). Meist verlaufen diese drei Prozesse parallel. In Lösung können die Silanole (häufig Silantriole) zu polymeren Aggregaten kondensieren, welche sich in Konkurrenz zu monomeren Silanolen auf der Oberfläche abscheiden (Abbildung 13 2a/2b konkurriert gegen 2c/2d). Durch Anbindung von Kondensationsaggregaten resultiert eine Schicht mit inhomogener Topographie. Dieses Verhalten lässt sich bei der Abscheidung aus der Flüssigphase durch unterschiedliche Parameter beeinflussen, wie zum Beispiel durch die Wahl der Lösungsmittel. Eine schnelle Hydrolyse der Silane erfolgt beispielsweise in polar-protischen Lösungsmitteln. Dies bewirkt jedoch auch meist eine Abscheidung der Kondensationsaggregate und weniger der Monomere. Der Gebrauch unpolar-protischer Lösungsmittel kehrt diesen Effekt um, benötigt jedoch

weitaus längere Hydrolysezeiten. Diese Zeit kann durch Erhöhen der Reaktionstemperatur oder durch Zugabe von katalytischen Mengen an Wasser, oder Säure⁹⁵ bzw. Base beschleunigt werden.

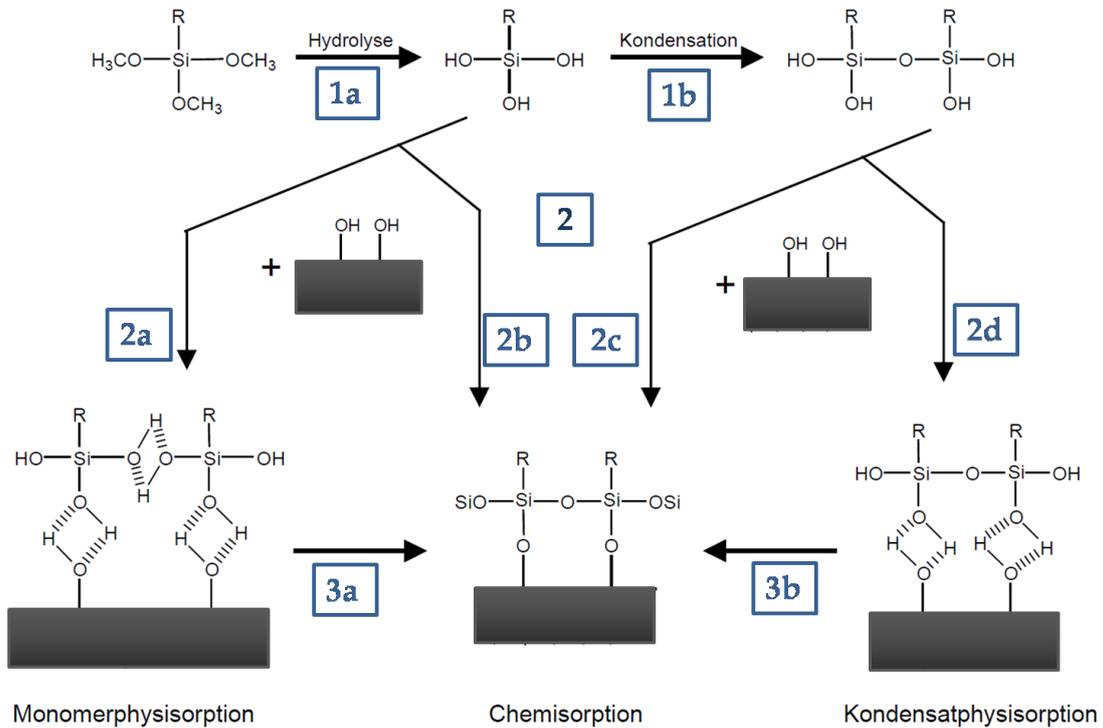


Abbildung 13: Schema der Silanabscheidung von Trimethoxysilanen auf hydroxyterminierten Oberflächen über die Flüssigphase.

Abbildung 14 zeigt das in dieser Arbeit verwendete Allyltrimethoxysilan zur Oberflächenanbindung von Hydrogelpolymeren durch Copolymerisation.

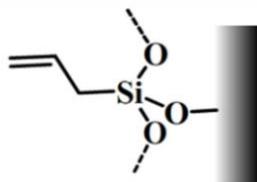


Abbildung 14: Zur Anbindung von PEG-Hydrogelen durch radikalische Copolymerisation verwendetes Allyltrimethoxysilan auf Glas.

2.3.4 Mikrokontakt-Drucken (*Microcontact-printing*)

Das Mikrokontakt-Drucken ist eine häufig angewandte, softlithographische Technik zur Erzeugung von Oberflächenstrukturen⁹⁶. Diese Stempeltechnik zeichnet sich durch geringen apparativen Aufwand, gute und schnelle Reproduzierbarkeit, sowie geringe Kosten aus. Ein durch bestimmte Strukturen geprägter Stempel wird dabei mit der zu übertragenden Substanz, der sogenannten Tinte, benetzt. Der Übertrag der Struktur erfolgt, wenn die „Tinte“ besser auf dem Oberflächensubstrat haftet als auf dem Stempel⁹⁷. Daher dient das Elastomer Polydimethylsiloxan (PDMS), aufgrund einer niedrigen Grenzflächenenergie ($21,6 \cdot 10^{-3} \text{ Jm}^{-2}$) besonders häufig als Stempelmateriale. Des Weiteren bietet PDMS Vorteile, wie chemische Inertheit, lange Haltbarkeit, Wiederverwertbarkeit, sowie die Möglichkeit der Modifikation der Oberflächeneigenschaften durch Plasmabehandlung^{98,99}. Dieser Einsatz von Elastomeren erlaubt sogar die Übertragung von Strukturen auf unebene oder gekrümmte Substratoberflächen und deckt einen Größenbereich der Strukturen von 30 nm bis 500 μm ab. Die Herstellung von selbstorganisierten Monoschichten (SAMs) gehört zu den am häufigsten genutzten Systemen. Dabei werden beispielsweise Alkanthiole als Tinte eingesetzt und über einen Stempel in einer strukturierten Anordnung als SAM auf Goldsubstrate übertragen.

2.4 Polyethylenglykol (PEG)

Polyethylenglykol (auch Macrogol genannt) ist ein Homopolymer, welches über eine Etherbrücke mindestens drei sich wiederholende Ethylenreste verknüpft. Die Darstellung des PEG-Polymers erfolgt durch eine alkalisch katalysierte Polymerisationsreaktion von Ethylenoxid. Dieses wird in ein heißes Ethylenglykol-Diethylenglykol-Wassergemisch (~130°C) eingeleitet. Nach Erreichen des gewünschten Molekulargewichts wird die Reaktion durch Zugabe von Säure (beispielsweise Milchsäure) beendet. Da die Ethylenoxid-Grundeinheit eine Molmasse von 44 g/mol besitzt, lässt sich unter Berücksichtigung der Masse des eingelagerten Wassers, die Anzahl der Ethylenoxid-Einheiten des jeweiligen PEG-Polymers bestimmen. Je nach Kettenlänge liegt das PEG in flüssiger (ca. bis 400 g/mol), pastöser (600-2500 g/mol) oder in fester Form (>3000 g/mol) vor. Mit zunehmender Masse nimmt dabei auch die Viskosität der wässrigen Lösungen zu. Desweiteren führt eine Massenzunahme zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes und der Härte des Polymers. Polyethylenglykole zeichnen sich durch stark hygroskopische Eigenschaften aus. Ihre Fähigkeit der Wasseraufnahme nimmt zwar mit steigender Kettenlänge ab, dennoch ist auch hochmolekulares PEG in Wasser sehr gut löslich. Hervorgerufen durch Wasserstoffbrückenbindungen von jeweils zwei Wassermolekülen pro Ether-Sauerstoff, wird PEG durch eine hochgeordnete Flüssigkeitsschicht umgeben¹⁰⁰. Aufgrund ihrer reaktionsträgen, untoxischen und biologisch inerten Eigenschaften, werden PEGs in vielen Bereichen eingesetzt. So finden sie Anwendung in der Kosmetik, im medizinischen Sektor als Wirkstoffträger, in industriellen Applikationen und in zahlreichen biologischen Forschungsbereichen.

2.4.1 Proteinabweisende Eigenschaft von PEG

Polyethylenglykole haben (beispielsweise in Form von Beschichtungen) in den letzten Jahren aufgrund ihres hohen Potentials unspezifischen Adsorptionen von Proteinen entgegenzuwirken, eine bedeutende Rolle im Bereich des medizinischen und biologischen Forschungssektors eingenommen^{101,230}. Verschiedene Theorien versuchen diese Eigenschaft der passivierenden Wirkung gegen Proteine zu erklären. Generell lässt sich sagen, dass die PEG-Wasser-Wechselwirkung einen großen Einfluss auf das Abstoßungsverhalten hat. Das Modell der sterischen Repulsion, welches durch De Gennes, Andrade und Jeon etabliert wurde^{102,103} besagt, dass sich die langen PEG-Polymere in Wasser schnell bewegen und somit die sich nähernden Proteine abstoßen¹⁰⁴. Eine Erhöhung der Oberflächendichte der gebundenen PEG-Moleküle bewirkt aufgrund von Streckung der PEG-Polymere eine Bildung von sogenannten Polymerbürsten, wodurch der Effekt der sterischen Abstoßung erhöht wird¹⁰⁵. Betrachtet man neben PEG-Beschichtungen die auch in dieser Arbeit verwendeten PEG-Hydrogele, weisen diese eine sehr dichte Formierung sowie einen hohen Wassergehalt auf. Dabei besitzen die oberflächlichen, frei beweglichen Ketten eine wesentlich höhere Mobilität als die komplett quervernetzten Ketten der Gelmasse. Die Oberfläche der Hydrogelpolymere zeigt somit aufgrund der frei beweglichen Ketten ein vergleichbares Verhalten wie die oberflächengebundenen Polymerbürsten¹⁰⁶. Eine weitere Theorie berücksichtigt die Volumenverringering welche durch Kompression der Polymerschicht durch die sich nähernden Proteine verursacht wird. Dieses Modell wird als Theorie der Volumeneinengung (*volume restriction theory*) bezeichnet. In diesem Fall können die Einzelsegmente aufgrund des komprimierten Zustands weniger Konformationen einnehmen als im entspannten Zustand, wodurch eine Entropieabnahme der Makromoleküle bedingt wird^{104,107}. Die Theorie des Ausschlussvolumens (*excluded-volume theory*) hingegen berücksichtigt ein Durchdringen der Oberfläche. Die dabei auftretende Entropie- und Enthalpieänderung bewirken eine entsprechende Änderung der freien Energie.

Bezogen auf das hygroskopische PEG-Protein-System ergeben sich hierbei eine Entropieabnahme und eine Enthalpiezunahme. Diese werden durch die Verdrängung von Wassermolekülen aus der PEG-Schicht bei Annäherung der Proteine und einer damit verbundenen Kompression (siehe oben) hervorgerufen¹⁰⁴. Die Folge ist eine Zunahme der freien Energie: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Daraus resultiert eine Abstoßung der Proteine anstelle einer Adsorption.

Betrachtet man die Proteinadsorption auf Polymeroberflächen, werden allgemein zwei Prinzipien verfolgt. Einerseits steht die Nachfrage nach proteinresistenten Oberflächen im Vordergrund, andererseits werden Polymere vermehrt gezielt modifiziert um selektive Adsorption von funktionellen Biomolekülen zu ermöglichen. So konnten beispielsweise Feng *et al.* das Adsorptionsverhalten von DNA kontrollieren, indem sie Polystyren-*block*-poly(tert-butylacrylat)-Schichten mit aminofunktionalisierten PEG-Ketten modifizierten¹⁰⁸. Auch in dieser Arbeit wurden Polyethylenglykole als Basismaterial verwendet um maßgeschneiderte Biosensoren zu generieren, welche gezielt funktionelle Anker-moleküle zur Untersuchung biologischer Systeme zur Verfügung stellten. Hierfür wurden insbesondere PEG-Hydrogele eingesetzt und modifiziert.

2.4.2 Hydrogele

Wie auch das Präfix *Hydro-* verdeutlicht, zeichnen sich diese wasserunlöslichen Gele durch eine extrem hohe Wasseraufnahmekapazität aus. Diese kann das 1000-fache ihres Eigengewichts betragen¹⁰⁹. In dem dreidimensionalen Polymernetzwerk herrscht ein Gleichgewicht aus abstoßenden Kräften zwischen den Polymerketten, hervorgerufen durch Kräfte, welche bei der Hydratisierung entstehen und kohäsiven Kräften, wie kovalente Quervernetzung (chemische Bindungen) und physikalische Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Wechselwirkungen). Die Wassereinlagerung spielt eine wichtige Rolle.

Wie in Kap. 2.4.1 beschrieben, ist sie beispielsweise ausschlaggebend für die proteinabweisende Wirkung der PEG-Hydrogele. Diese bieten eine sehr gute Biokompatibilität. Sie weisen aufgrund ihres hohen Wassergehalts und ihrer Konsistenz physikochemische Ähnlichkeit zur nativen Extrazellulären Matrix (EZM) auf^{110,111} und stellen somit eine gute Basis zur Untersuchung zahlreicher biologischer Fragestellungen. Der Quellvorgang der Hydrogele erfolgt zunächst durch die Wassereinlagerung aufgrund von Interaktion mit vorhandenen hydrophilen, funktionellen Gruppen (wie, Hydroxy-, Carboxyl-, Amidgruppen...) im Polymernetzwerk. Dieses adsorbierte Wasser wird als „primär gebundenes Wasser“ bezeichnet. Hervorgerufen durch den Platzbedarf dieser Wassermoleküle, werden die Polymerketten auseinandergedrängt. Hierdurch wird das Eindringen von weiterem Wasser ermöglicht. Nach vollständiger Hydratisierung der hydrophilen Gruppen wechselwirkt das weiter eindringende Wasser mit dem primär gebundenen Wasser. Die so erzeugte Wasserschicht (sekundär gebundenes Wasser) zwischen den Polymerketten vergrößert das Netzwerk und verursacht die Quellung des Gels. Aufgrund osmotischer Kräfte kommt es zur weiteren Einlagerung von sogenanntem „Freiem Wasser“ oder auch „Bulkwasser“ (Abbildung 15). Da die Elastizität von chemischen Bindungen begrenzt ist, weist ein chemisch vernetztes Gel, wie es auch in dieser Arbeit verwendet wurde, eine eingeschränkte Quellfähigkeit auf. Die Terminierung der Quellung erfolgt, wenn der osmotische Druck und die kovalenten Bindungen im Gleichgewicht miteinander stehen^{112,109}. Dies erklärt, dass die Wasseraufnahmekapazität aufgrund eingeschränkter Bewegungsfreiheit der Polymerketten im Falle eines hohen Vernetzungsgrades abnimmt. Das Quellverhalten steht somit in Relation zum Grad der Quervernetzung sowie der Polarisierung des Polymers (Hydrophilie, Hydrophobie)¹¹³.

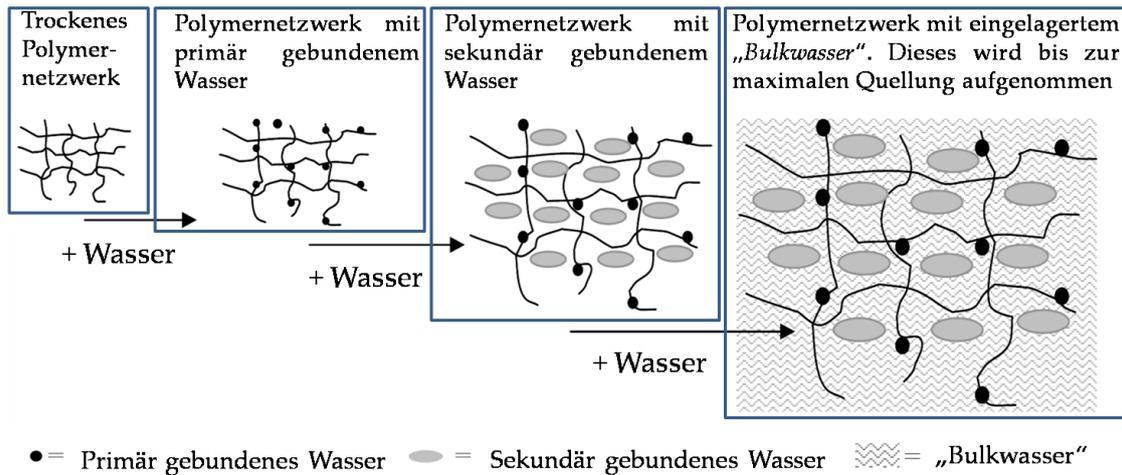


Abbildung 15: Schematisch dargestellter Ablauf des Quellvorgangs von Hydrogelen.

Die Berücksichtigung des Quellverhaltens, des in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenglykol-Diacrylat-Hydrogels, war insbesondere für die präparative Herstellung von oberflächengebundenen Gelsubstraten zur biologischen Anwendung von großer Bedeutung (Abbildung 16). Hierbei wird durch die Volumenänderung eine deutliche mechanische Belastung hervorgerufen. Aufgrund der Fixierung des Gels auf der Oberfläche kann sich dieses folglich nicht isotrop ausdehnen oder zusammenziehen, wodurch ein Ablösen oder Reißen induziert wird¹¹⁴. Ergänzend spielte die Wasseraufnahmekapazität und somit die Polymerkonzentration eine wichtige Rolle für die Generierung von Hydrogelsubstraten mit einem umfangreichen Wertebereich der Elastizitäten.

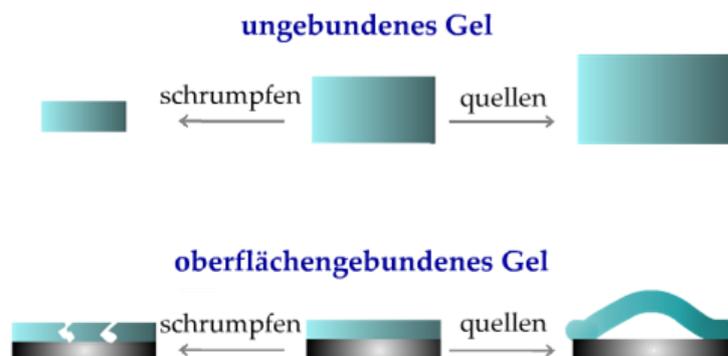


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Quellverhaltens freier und oberflächengebundener Hydrogele.

2.4.3 Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)-Hydrogele

Quervernetzung des Polymers und dessen mechanische Eigenschaften (Maschengröße, Elastizitäten)

Die Elastizität eines Hydrogels ist stark von dessen Grad der Quervernetzung abhängig. Des Weiteren lässt sich die Festigkeit über die Wahl des Makromers beeinflussen. In dieser Arbeit wurden PEG-Makromere durch endständige, reaktive Acrylatgruppen modifiziert und durch eine gut kontrollierbare, UV-induzierte Radikalreaktion quervernetzt. Tabelle 2 zeigt die zur Hydrogelbildung gewählten Polyethylenglykol-Diacrylate (PEG-DA).

Tabelle 2: Verwendete PEGDA- Polymere

Polymer	Molekulargewicht [g/mol]	Reaktions-Lösungsmittel	Aufbewahrungs-lösungsmittel
PEG-700-DA	700	Wasser	Wasser oder PBS
PEG-10000-DA	10000	Wasser	Wasser oder PBS
PEG-20000-DA	20000	Wasser	Wasser oder PBS
PEG-35000-DA	35000	Wasser	Wasser oder PBS

Die radikalische Polymerisationsreaktion wurde durch den Photoinitiator 4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl-(2-propyl)keton induziert, welcher sich durch seine nicht-zytotoxischen Eigenschaften und seine gute Wasserlöslichkeit auszeichnet. Da die thermisch induzierte Reaktion wesentlich unspezifischer und daher deutlich schwerer zu kontrollieren ist, wurde die Radikalreaktion durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 365 nm durchgeführt. Der Initiator wird dabei in die aktive Form überführt (Abbildung 17), welche im Folgenden die Polymerisationsreaktion auslöst.

Initiator

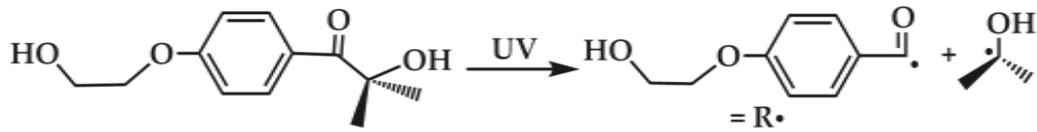


Abbildung 17: Heterolytischer Zerfall des Radikalbildners 4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl-(2-propyl)keton unter UV-Bestrahlung (365 nm).

Der hochreaktive Initiator generiert durch Angreifen der endständigen, ungesättigten Bindung des PEG-DAs ein freies Radikal (Abbildung 18). Diese aktive Einheit überträgt nun die Radikalfunktion während der Kettenverzweigungs- (Kettenwachstums) Reaktion auf das jeweils letzte addierte PEG-DA-Makromer.

Initiierung

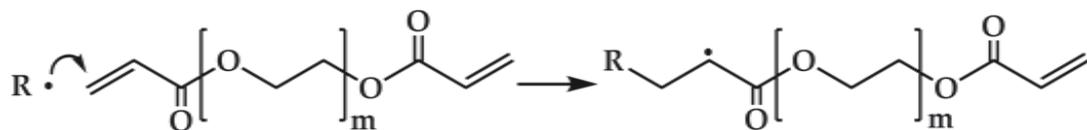


Abbildung 18: Initiierung der Reaktion durch Angriff des reaktiven Initiatorradikals.

Dieser Vorgang wiederholt sich fortlaufend und bewirkt so die Quervernetzung der PEG-DA-Makromere zu dem gewünschten Hydrogelpolymer (Abbildung 19).

Propagierung

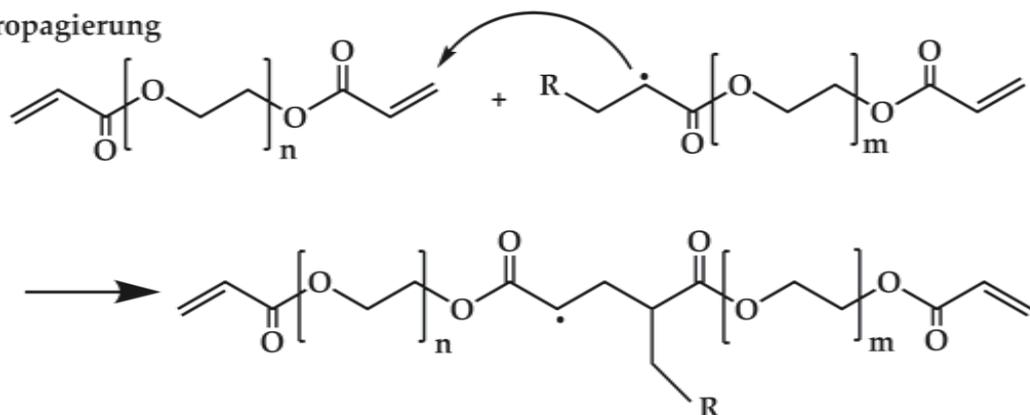


Abbildung 19: Kettenwachstums/-verzweigungsreaktion der PEG-DA-Makromere.

Dieser Mechanismus der Kettenvernetzung wurde in dieser Arbeit nicht nur zur Quervernetzung der Hydrogele, sondern auch zur kovalenten Bindung des in Kap. 2.3.2 vorgestellten Linkersystems N, N'-Bis(acryloyl)cystamin zur Übertragung der Goldnanopartikel auf Hydrogelpolymere und des in Kap. 2.3.3 aufgeführten Allyltrimethoxysilans zur Anbindung der Gele an Glasoberflächen in Form einer Copolymerisation genutzt (siehe Kap. 4.1.9).

Die Terminierung der Radikalreaktion erfolgt schließlich durch Rekombination zweier aktiver Radikale (Abbildung 20) oder durch Disproportionierung.

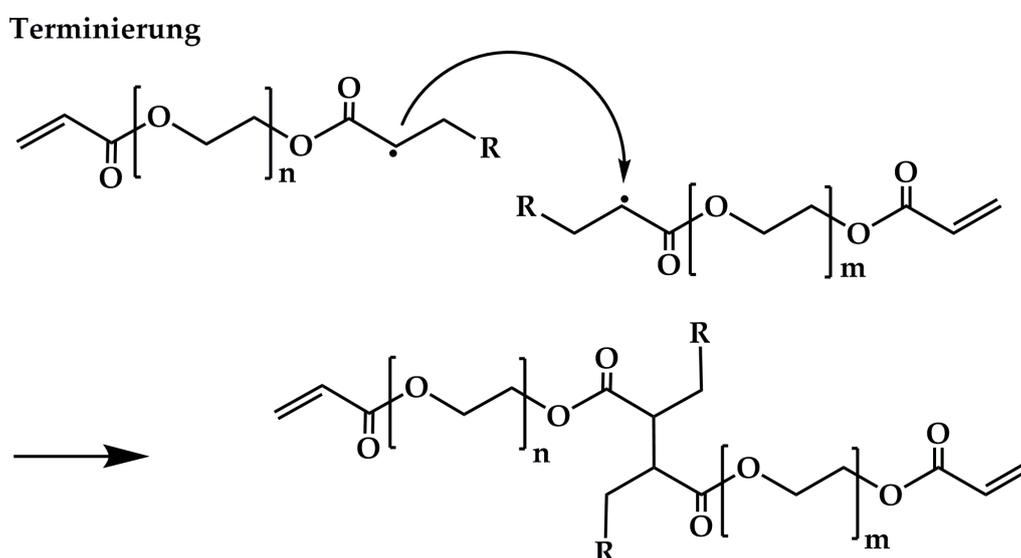


Abbildung 20: Terminierung der radikalischen Polymerisation durch Rekombination zweier aktiver Einheiten.

Der Grad der Quervernetzung (Vernetzungsdichte) wird durch die Anzahl der Vernetzungen pro Molekulargewicht definiert. Dieser Faktor nimmt großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Gels, wie Quellverhalten und Elastizität¹¹⁵. Eine weitere Definitionsmöglichkeit zur Beschreibung des Vernetzungsverhaltens bietet die sogenannte Korrelationslänge oder Maschengröße ξ . Diese bezeichnet den Abstand zwischen den fortlaufenden Vernetzungspunkten¹¹⁶. Die Parameter des Netzwerks können durch verschiedene experimentelle Techniken sowie durch Berechnungen dargestellt werden. Dabei werden insbesondere kinetische bzw.

statistische Methoden eingesetzt. Die kinetischen Modelle (z.B. Betrachtung von Massenbilanzen) stellen eine klassische Näherung (Molekularfeldnäherung) dar und geben somit ein Bild über die durchschnittlichen Systemeigenschaften. Um detailliertere Einblicke in die Bildungsprozesse des Netzwerks zu erhalten, wurden statistische Modelle wie das *Monte Carlo* Modell für das System angewandt, welches Inhomogenitäten des Systems berücksichtigt¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Die Maschengröße bzw. die Vernetzungsdichte wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Hierzu gehört die Konzentration der reaktiven Gruppen. Je größer die Anzahl der reaktiven Einheiten, desto höher ist die Vernetzungsdichte¹¹⁹. Ein weiterer Aspekt ist die Länge des Makromers. Hierbei bewirken längere Makromere eine Verringerung der Vernetzungsdichte¹²⁰. Ebenfalls Einfluss auf den Grad der Vernetzung hat die Konzentration der Makromere. Mit höherer Konzentration nimmt die Dichte der Vernetzungspunkte entsprechend zu¹²¹. So umfasst beispielsweise die Maschengröße eines PEG-DA-3500 Polymers je nach Konzentration einen Bereich von 40-140 Å¹²¹.

Neben den Eigenschaften des verwendeten Makromers, spielen zwei weitere Faktoren in Bezug auf die Quervernetzung der Gele eine wichtige Rolle. Ein wichtiger Aspekt ist die Bestrahlungszeit während des Kreuzvernetzungsprozesses. Längere Bestrahlung führt hierbei zu einer stärkeren Vernetzung¹²⁰. Auch in dieser Arbeit wurden unterschiedliche Bestrahlungszeiten verwendet, welche zu verschiedenen Resultaten führten (Kap. 5.5.5). Der zuletzt genannte Faktor ist die Konzentration des Initiators¹²². Bei der Wahl der Initiatorkonzentration muss folgendes beachtet werden. Kinetisch betrachtet führt eine hohe Konzentration zu einer schnellen Reaktion und somit zu einer heterogenen Bildung der molekularen Struktur des Polymers. Da es sich bei dem Initiator um ein Radikal handelt, kann dieser die Reaktion nicht nur initiieren sondern durch Reaktion mit Makromer-Radikalen auch inhibieren. Aus diesem Grund wird die Konzentration des Initiators nur so hoch gewählt, um eine ausreichende Kettenreaktion zu gewährleisten.

Die Elastizität der Hydrogele hängt sowohl vom Grad der Quervernetzung als auch von der Wahl des Makromers und dessen Molekulargewicht ab. In Bezug auf die Vernetzungsdichte ist dabei ebenso die Konzentration des Makromers entscheidend. Dem Hooke'schen Gesetz zu Folge bewirkt eine Belastung (Zug oder Druck) σ (Kraft pro Fläche), die auf ein isotropes Material (hier das Hydrogel) wirkt, eine relative elastische Verformung ε (Längenänderung/Länge), welche proportional zur einwirkenden Belastung ist. Als Maß der Elastizität wird das sogenannte Elastizitätsmodul E (E-Modul), auch als *Young's Modulus* bezeichnet, definiert. Dieses ergibt sich durch $E_Y = \sigma / \varepsilon$ ¹²³.

H. Hertz entwickelte (1882) die theoretische Grundlage zur Beschreibung der in Druckexperimenten auftretenden elastischen Deformationen^{124,125}. Die Elastizitätsmessung der verwendeten Hydrogele wurde mittels Rasterkraftmikroskopie AFM (*Atomic Force Microscopy*) durchgeführtⁱⁱⁱ. Dabei wurde zur Datenanalyse das sogenannte Hertzmodell des Konus herangezogen und für eine konisch geformte Spitze mit einem halbvertikalen Öffnungswinkel α angepasst. Die Gesamtkraft F ist demnach eine Funktion der Druckänderung Δz und ist gegeben durch Formel 9.

$$F_{Konus}(\Delta z) = 2 \frac{E_Y^*}{\pi \tan(\alpha)} \Delta z^2 \quad \text{mit} \quad E^* = \frac{E_{Substrat}}{1 - \mu_{Substrat}^2} \quad \text{Formel 9}$$

In diesem Fall ist das E-Modul (*Young's Modulus*) der Cantilever Spitze deutlich höher als das des gemessenen Substrats¹²⁶. Aufgrund des hohen Wassergehalts der PEG-DA-Hydrogele wird hier die Poissonzahl (auch Querkontraktionszahl) μ als 0,5 angenommen.

ⁱⁱⁱ Die in dieser Arbeit aufgeführten AFM-Messungen wurden durch Dr. Ilia Louban durchgeführt.

2.5 Zelladhäsion und Zellbewegung

2.5.1 Die Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) setzt sich aus einem Geflecht aus Proteinen und Polysacchariden zusammen. Die EZM kann unterschiedlichste Formen annehmen, welche von entsprechend spezialisierten Zellen gebildet werden. EZM-Moleküle werden unter anderem durch Zellen exprimiert und orientiert¹²⁷, sodass sie die Bedingungen ihrer Umwelt beeinflussen können. Andererseits gibt die EZM die chemischen, mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Umgebung der Zelle vor. Diese werden durch ihre Zusammensetzung und die Anordnung diverser Polysaccharide und Proteine bestimmt. Durch die Einflüsse der EZM-spezifischen Eigenschaften wird das Verhalten der eingefassten Zellen (Abbildung 21), wie Entwicklung, Migration, Proliferation, Zellform und Zellfunktion reguliert. Die Hauptbestandteile der EZM setzen sich aus zwei Klassen zusammen. Die sogenannten Faserproteine¹²⁸, wie Kollagen, Fibronectin, Laminin und Elastin geben der EZM ihre mechanische Stabilität und Struktur. Des Weiteren bieten sie den Zellen strukturell definierte sowie chemisch spezifische Adhäsionspunkte. Die zweiten Hauptbestandteile bilden Proteoglykane¹²⁹. Diese an Proteine gebundenen Glykosaminoglykane (GAGs) sind Polysaccharide, welche durch substituierte Aminozucker stark negativ geladen sind. Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaft bilden sie schon in geringen Konzentrationen voluminöse Gele, welche einen großen Teil der EZM bilden und aufgrund ihres Quelldrucks hohen Druckbelastungen standhalten. Neben dieser Wirkung besitzen Proteoglykane auch weitere funktionelle Aufgaben. Sie binden beispielsweise an Wachstumsfaktoren, dienen als Co-Rezeptoren oder auch als Filter, wie beispielsweise in der Niere.

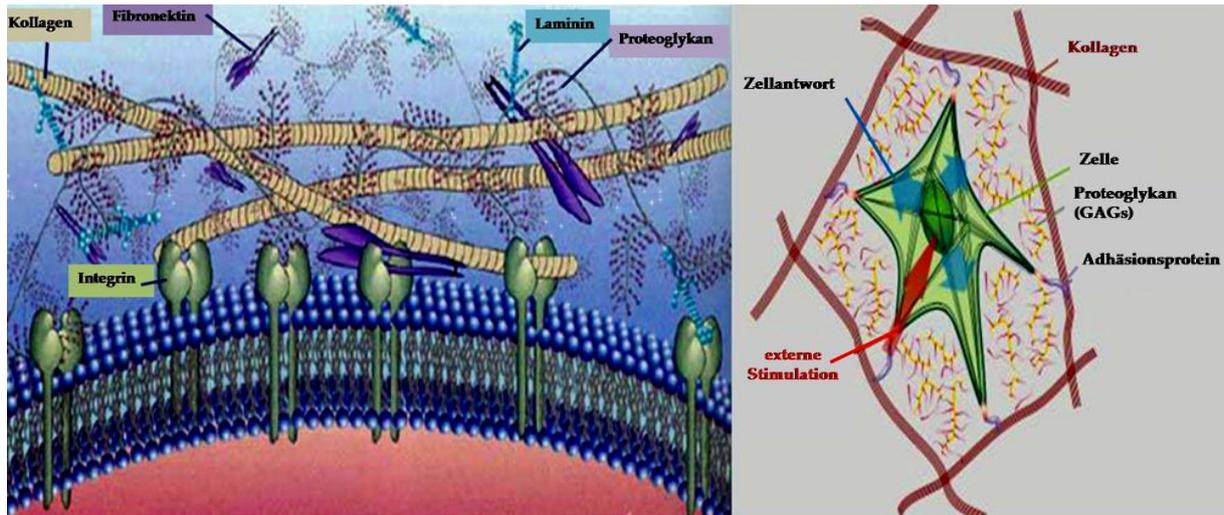


Abbildung 21: Schematische Darstellung der EZM¹³⁰ (links). Darstellung einer Zelle in der EZM (rechts).

Im Folgenden werden einige Bestandteile der EZM, welche in dieser Arbeit zur Oberflächenfunktionalisierung verwendet wurden, genauer vorgestellt.

Kollagen:

Kollagen gehört zur Gruppe der Faserproteine. Derzeit sind 28 verschiedene Typen bekannt. Zur experimentellen Anwendung wurde in dieser Arbeit das Kollagen Typ I genutzt. Dieses kommt in Bindegeweben, Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel sowie in der Hornhaut des Auges vor und besteht aus drei linksgängigen α -Ketten, welche sich seilartig zu einer rechtshändigen Tripelhelix umeinander winden. Die Stabilität und der Drehsinn werden durch repetitive Einheiten der Aminosäuren Glycin, Prolin und 4-Hydroxyprolin gewährleistet. Durch intramolekulare Verknüpfungen (Aldolbindungen) bilden sich sogenannte Fibrillen. Diese aggregieren wiederum zu Fasern (Abbildung 22). Die Biosynthese der einzelnen Kollagen-Polypeptidketten erfolgt im endoplasmatischen Retikulum. Anschließend werden diese im Lumen des endoplasmatischen Retikulums hydroxyliert.

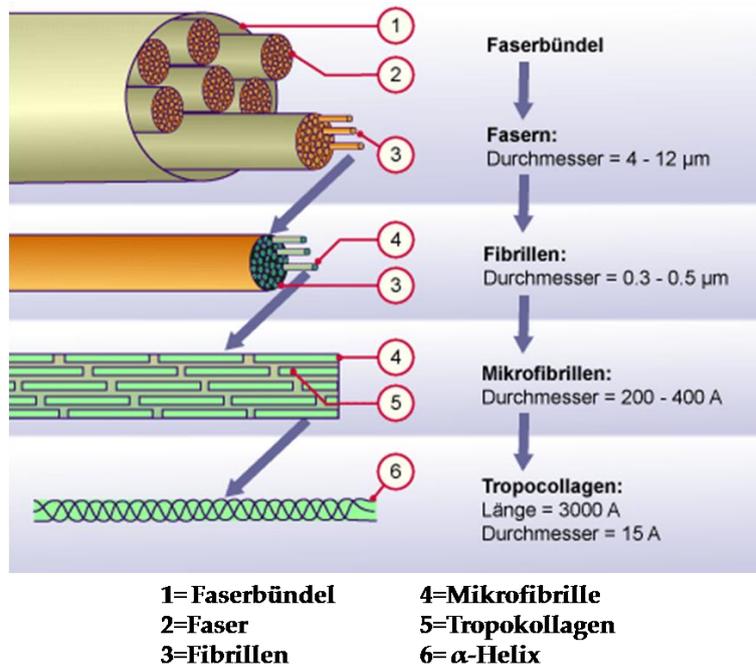


Abbildung 22: Schematischer Aufbau von Kollagenfasern¹³¹.

Kollagen zeichnet sich insbesondere durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber starken Zugbelastungen aus und verleiht der EZM Struktur und Stabilität. In der hier künstlich hergestellten EZM wurde der Einfluss des Kollagens durch die variierbaren mechanischen und elastischen Eigenschaften des Modellsystems (Hydrogel) imitiert. Des Weiteren wurde Kollagen ebenfalls direkt an das Hydrogelsystem gebunden, um die Reaktion von *Plamodium* Sporoziten und deren Bewegungsverhalten auf Kollagen-bedeckten Oberflächen zu studieren.

Fibronektin:

Fibronektin liegt sowohl als lösliche Form, in der es im Blutplasma zirkuliert und beispielsweise an der Wundheilung und Blutgerinnung beteiligt ist, als auch in einer zu Fasern aggregierten unlöslichen Form vor. In dieser fibrillären Form ist es Bestandteil der EZM. Das Glykoproteindimer ist 60-70 nm lang und setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen, welche über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Diese Ketten sind jeweils aus ca. 2500 Aminosäuren aufgebaut, welche 5-6 Domänen mit unterschiedlichen Funktionen bilden¹³² (Abbildung 23).

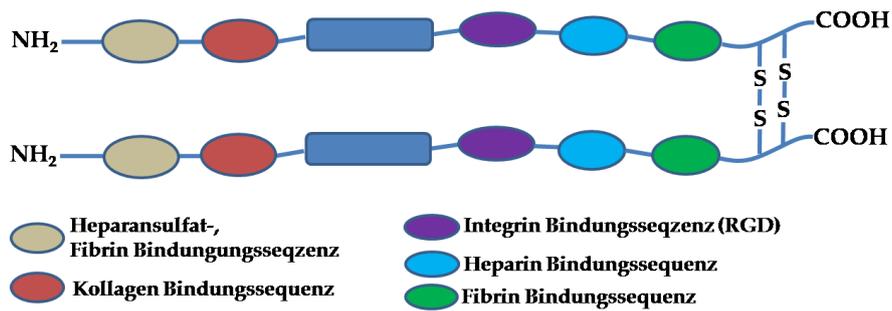


Abbildung 23: Schematische Darstellung von Fibronectin, welches sich aus zwei Polypeptidketten zusammensetzt und Bindungsstellen für Heparin, Fibrin, Kollagen sowie ein RGD-Bindungsmotiv für Integrinbindung aufweist.

Fibronectin gehört zu den sogenannten Multiadhäsionsproteinen. Es enthält eine RGD Sequenz. Dieses Peptid setzt sich aus Arginin (R), Glycin (G) und Aspartat (D) zusammen und bindet spezifisch an Transmembranrezeptoren wie Integrine^{133,134}. Dabei verhält es sich promiskuitiv und stellt für mehrere Integrintypen einen passenden Liganden dar¹³⁵. Das RGD-Bindungsmotiv befindet sich auf dem sogenannten Typ III Modul (FN III₁₀) und kommt einmal pro Monomer vor. Neben dieser Bindungssequenz befindet sich ebenfalls eine Bindungseinheit für Kollagenfasern des Typs I, II, III und V. Fibronectin spielt somit eine wichtige Rolle bei der mechanischen Verknüpfung von Zellen mit der EZM. In dieser Arbeit wurde sowohl die zyklische Peptidsequenz RGD zur Adhäsionsförderung auf spezifisch modifizierten Oberflächensubstraten angeboten, als auch Fibronectin.

Laminin:

Laminine gehören zur Gruppe der nicht kollagenen Glykoproteine. Sie sind Bestandteil der EZM und stellen eine der Hauptkomponenten der Basalmembran dar^{136,137}. Laminin setzt sich aus jeweils drei Proteinketten zusammen. Bisher wurden fünf verschiedene α -Ketten, drei β -Ketten und ebenfalls drei verschiedene γ -Ketten nachgewiesen. Diese sind durch Disulfidbrücken verknüpft und bilden so das große (900 kDa), kreuzförmige Glykoprotein¹³⁶. Bisher sind fünfzehn Lamininisoformen

bekannt, die sich in heterotrimerer Form aus den jeweiligen α -, β - und γ -Ketten zusammenfügen (Abbildung 24). Laminine weisen Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren auf und bewirken eine Vielzahl von Basalmembran-Zell-Interaktionen, wie Adhäsion, Migration und Proliferation¹³⁷.

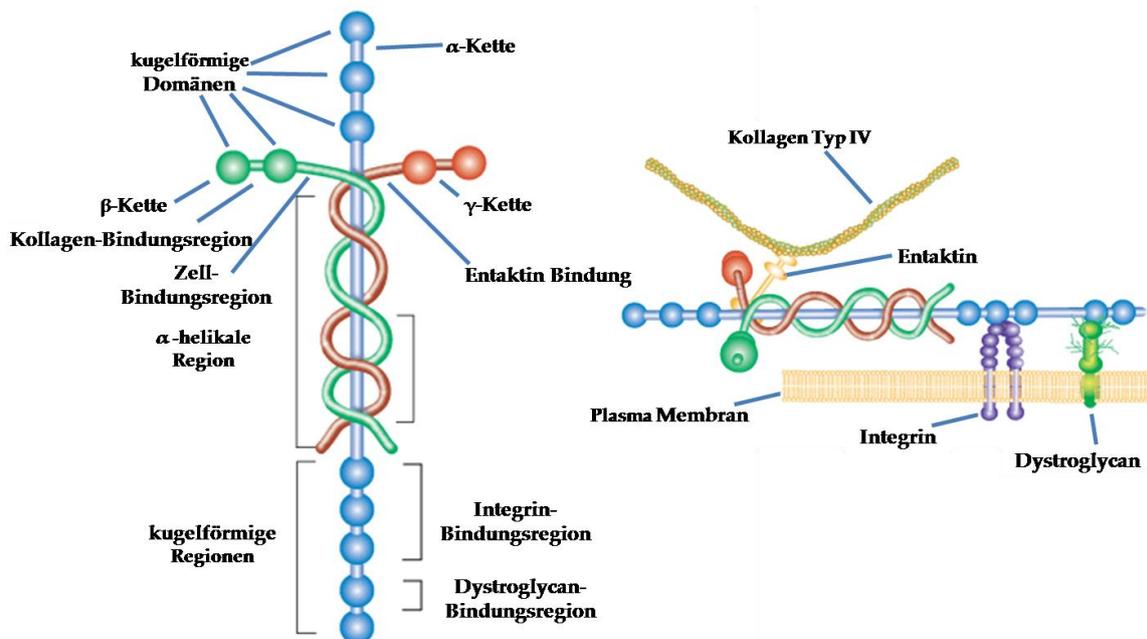


Abbildung 24: Schematische Darstellung des kreuzförmigen Glykoproteins Laminin. Dieses weist unterschiedliche Bindungsdomänen auf, wie für Kollagen Typ IV und weiteren Basalmembranbestandteilen (Entaktin) sowie für Integrin¹³⁸.

Heparin/ Heparansulfat:

Heparin gehört zur Gruppe der Glykosaminoglykane. Es setzt sich aus D-Glukuronsäure durch β -(1,4)-glykosidische, bzw. L-Iduronsäure durch α -(1,4)-glykosidische Verknüpfung mit Glukosamin zusammen. Die Verknüpfung zwischen den verschiedenen Disacchariden ist α -(1,4)-glykosidisch¹³⁹. An der Aminofunktion des Glykosamins befindet sich häufig eine Acetyl- oder Sulfatgruppe (Abbildung 25).

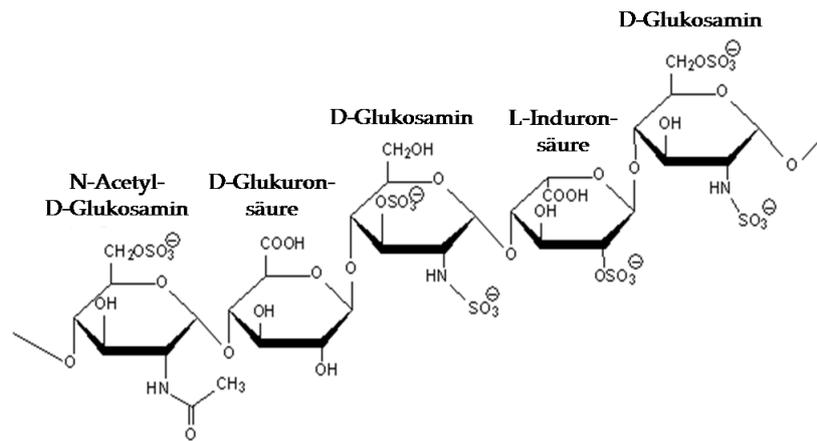


Abbildung 25: Strukturformel von Heparin.

Heparine sind als blutgerinnungshemmende Substanzen bekannt und werden zu diesem Zweck auch therapeutisch eingesetzt. Das strukturell verwandte Heparansulfat besitzt anstelle der N- und O-Sulfatreste vorwiegend N-Acetylgruppen. Es ist Bestandteil der Basalmembran und wirkt dort beispielsweise als ionenselektiver Filter. Des Weiteren tritt Heparansulfat am Randbereich elastischer Fasern auf¹⁴⁰. Je nach Zusammensetzung der Disaccharide treten noch weitere Untergruppen der Glykosaminoglykane in der EZM auf, wie Hyaluronsäure (diese ist als einziges Glykosaminoglykan nicht an ein zentrales Proteinfilament gebunden), Chondroitinsulfat/ Dermatansulfat und Keratansulfat. Auf diese wird im Weiteren nicht genauer eingegangen.

Poly-L-Lysin:

Neben diesen typischen EZM-Bestandteilen wurde in dieser Arbeit ebenfalls Poly-L-Lysin zur Funktionalisierung der Substratoberflächen genutzt. Poly-L-Lysin ist ein Homo-Polypeptid, welches sich aus ca. 25-35 L-Lysin-Einheiten (Abbildung 26) durch Peptidbindungen zusammensetzt. Poly-L-Lysin stellt einen unspezifischen Adhäsionsfaktor für Zellen dar und wird häufig zur Förderung von Zelladhäsion auf festem Substrat verwendet¹⁴¹⁻¹⁴³. Aufgrund der positiven Ladung von Poly-L-Lysin

induziert es eine elektrostatische Wechselwirkung mit den negativen Ionen der Zellmembran.

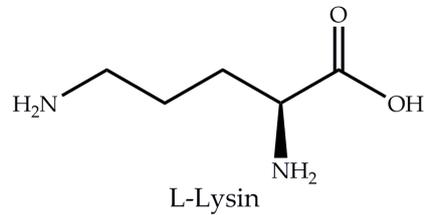


Abbildung 26: Strukturformel von L-Lysin.

2.5.2 Transmembranrezeptoren

Äußere Einflüsse, wie die mechanischen Eigenschaften der EZM, oder auch das Vorhandensein externer Signalmoleküle, beeinflussen das Verhalten von Zellen entscheidend. In diesem Zusammenhang spielen Zelloberflächenrezeptoren eine wichtige Rolle. Mit diesem Hintergrund ist die Generierung künstlicher Systeme, durch welche das Zellverhalten und insbesondere die Funktionsprinzipien der Zellrezeptoren kontrolliert und verstanden werden können, von großem Interesse. Adhäsionsrezeptoren werden selektiv durch spezifische Bindungsmoleküle gebunden. Häufige Anwendung findet beispielsweise die hochselektive Bindung von RGD-Derivaten an Transmembranrezeptoren der Integrinfamilie¹⁴⁴.

Transmembranrezeptoren sind Proteine, welche sowohl eine intrazelluläre als auch eine extrazelluläre Domäne besitzen. Die extrazelluläre Domäne zeichnet sich durch eine hochspezifische Bindungsfähigkeit von bestimmten Liganden aus. Die intrazelluläre Domäne übernimmt die Aufgabe intrazelluläre Signalkaskaden durch Änderung der Konformation oder durch Bindung weiterer Proteine zu induzieren.

Zelloberflächenrezeptoren lassen sich in zwei Hauptgruppen unterscheiden. Je nach Funktion werden sie der Klasse der Adhäsionsrezeptoren (CAMs = *cell adhesion molecules*) oder der Signalgebungsrezeptoren zugeordnet. Im Folgenden werden

hauptsächlich die Adhäsionsrezeptoren aufgeführt. Diese werden nochmals in Rezeptoren klassifiziert, welche, wie Integrine, für Zell-EZM-Verbindungen verantwortlich sind, und Rezeptoren, welche Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Zu Letzteren gehören beispielsweise Cadherine, Mucine und Immunglobuline (Abbildung 27).

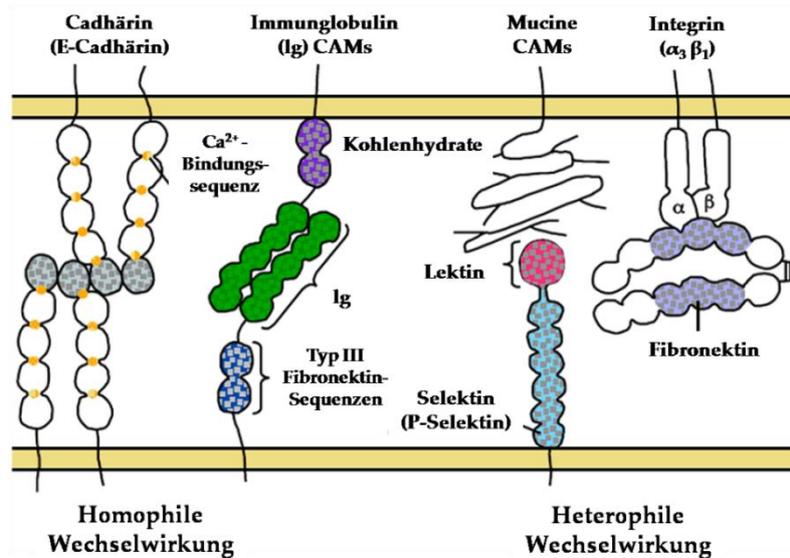


Abbildung 27: Transmembranproteine der Zelladhäsionsmolekül-Klasse (CAMs)¹⁴⁵.

Integrine:

Eine wichtige Gruppe der Transmembranproteine repräsentiert die Familie der Integrine. Diese Adhäsionsrezeptoren sind für Zell-EZM-Kontakte verantwortlich. Integrine setzen sich aus zwei nicht-kovalent verbundenen Einheiten zusammen, den sogenannten α - und β -Transmembranuntereinheiten. Im menschlichen Körper sind neun Formen der β -Einheiten und 24 α -Einheiten bekannt. Diese bilden in unterschiedlichen Kombinationen eine Vielzahl an Integrinen, welche spezifisch diverse EZM-Proteine binden. So sind beispielsweise acht Integrintypen für die Bindung von Fibronectin bekannt, während weitere fünf spezifisch an Laminin binden. Die RGD-Peptidsequenz, wie sie auch in Fibronectin vorkommt, stellt ein besonders häufiges Bindungsmotiv für spezifische Integrinbindung dar¹⁴⁴. Die

spezifische Bindungsstelle der Integrine zur Anlagerung der Liganden befindet sich in den globulären Domänen der extrazellulären Einheit^{146,147}. Hervorgerufen durch die Bindung der extrazellulären Einheit an einen Liganden erfolgt die Aktivierung des Integrins. Hierbei kommt es zur Konformationsänderung der intrazellulären Domänen, wobei sie sich in einer voneinander weggespreizten Anordnung formieren^{148, 149}. In dieser aktivierten Anordnung kommt es unter bestimmten Bedingungen zur Bildung von sogenannten Integrinclustern. Diese Anhäufungen von Integrinen zu Homodimeren oder Homotrimeren wurden *in vitro* beobachtet¹⁵⁰ (Abbildung 28).

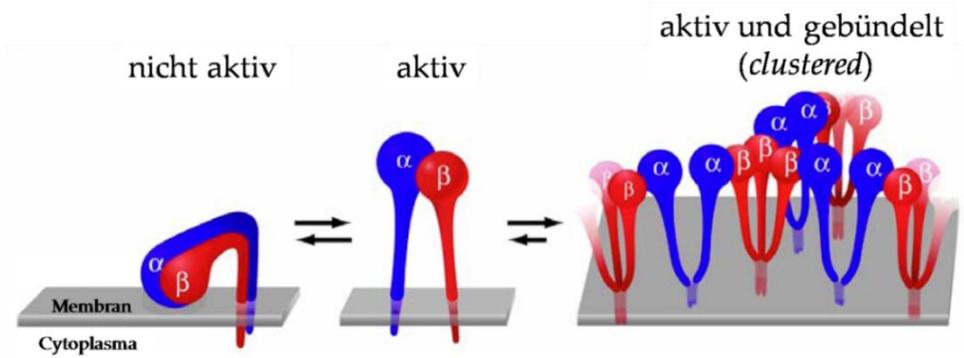


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Aktivierung und Clusterbildung von Integrinen¹⁵⁰.

Aktivierte Integrine bilden nun durch Wechselwirkung mit verschiedenen intrazellulären Adhäsionsmolekülen (iCAMs), wie Aktin oder Vinculin, sogenannte *Cluster* aus. Diese Integrin-vermittelten Adhäsionskomplexe treten in unterschiedlichen Formen auf, beispielsweise als fibrilläre Adhäsionen, Podosomen, Fokalkomplexe oder Fokaladhäsionen¹⁵¹ (Abbildung 29). Die Verknüpfung der EZM-Komponenten mit dem intrazellulären Fasernetzwerk innerhalb einer Fokaladhäsion beruht auf einer Verlinkung der extrazellulären Domäne periodisch angeordneter Integrine an spezifische Liganden der EZM, während die zellinterne Domäne eine Proteinhäufung der gebundenen Proteine ausbildet. Diese spezifische und komplexe Verankerung ermöglicht die Weitergabe mechanischer Signale von der

EZM in die Zelle sowie in umgekehrter Richtung die Vermittlung der Zellantwort^{152,153}. Die Adhäsionskontakte fungieren demnach als multifunktionale Sensoren, welche strukturelle, chemische und mechanische Einflüsse zwischen der EZM und Zellen vermitteln.

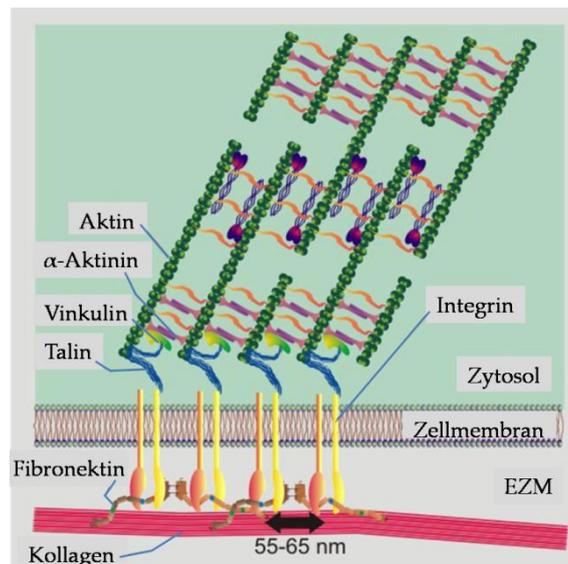


Abbildung 29: Darstellung eines durch Integrin vermittelten Adhäsionskomplexes¹⁵⁴.

Die *strukturellen Einflüsse* der EZM und die damit verbundenen Wechselwirkungen mit der Zelle zeigen sich beispielsweise im Adhäsionsverhalten bei Veränderung der chemischen Anordnung, also der Adhäsionsliganden in der EZM. Dieses Verhalten wurde durch Spatz *et al.* anhand künstlicher, nanostrukturierter Substratoberflächen demonstriert. Diese Nanostrukturen wurden mittels RGD funktionalisiert und mit unterschiedlichen, definierten Partikelabständen den Zellen zur Adhäsion angeboten. Hierbei erwies sich eine geordnete Formierung der Partikel mit Abständen von 58 nm als guter Abstand zur Bildung von fokalen Adhäsionskontakten. Dies korreliert mit den regelmäßigen Abständen der RGD-Sequenzen in Fibronectinfasern. Im Falle einer Vergrößerung der Partikelabstände und somit der Adhäsionsmoleküle auf 73 nm und mehr, wurde eine eingeschränkte Bildung von Fokaladhäsionen beobachtet, welche auf eine fehlende Anordnung von

Integrinclustern zurückzuführen war³⁶ (Abbildung 30). Diese Beobachtungen zeigten, dass der entscheidende Faktor nicht der durchschnittliche Abstand der Liganden selbst, sondern die Regulierung der Integrinfunktion in Abhängigkeit der nanoskopischen Abstände der einzelnen RGD-Sequenzen ist.

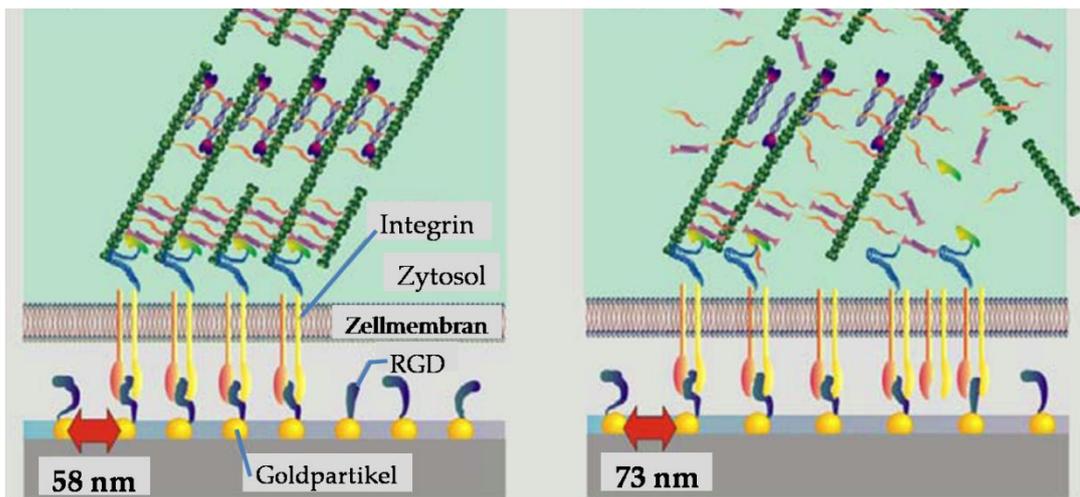


Abbildung 30: Integrinbindung an periodisch angeordnete RGD-Sequenzen. Links: Abstände von 58 nm erlauben die Ausbildung von Integrinclustern. Rechts: Bei Abständen von 73 nm oder mehr können Integrine keine Cluster ausbilden.

Chemische Einflüsse zwischen Zellen und der EZM sind ebenfalls von großer Bedeutung. Wie schon erwähnt kann die chemische Signalleitung beispielsweise über Oberflächenrezeptoren erfolgen, welche mit spezifischen Liganden wechselwirken. Dabei sind für jeden Zelltyp und jede Zellfunktion individuelle receptorspezifische Liganden und auch die Ligandenkonzentration von Bedeutung. So zeigen beispielsweise Osteoblasten auf Oberflächen mit einem Osteopontinderivat-Peptid ein anderes Migrationsverhalten als auf Oberflächen mit GRGDS-Peptid ($H - Gly - Arg - Gly - Asp - Ser - OH$) bei gleicher Konzentration der Liganden¹⁵⁵. Der Einfluss der Dichte der Adhäsionsmoleküle zeigt sich im Falle der Osteoblasten ebenfalls. Diese bewegen sich bei einer höheren RRGDS-Peptid-Konzentration schneller¹⁵⁵. Zudem spielt das Vorhandensein und die Konzentration

von Signalgebungsmolekülen, welche die Expression von EZM Komponenten aktivieren oder von Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle^{156,157}.

Mechanische Einflüsse und die damit verbundene Wechselwirkung zwischen EZM und Zellen wirken sich in verschiedensten Formen aus. Generell reagieren Zellen sehr sensitiv auf die Festigkeit der EZM. Vergleicht man unterschiedliche Zelltypen miteinander, so zeigt sich, dass diese unterschiedlich feste Umgebungen bevorzugen^{158,159}. Um die Beziehung zwischen Oberflächenfestigkeit und einer auf diesem Substrat adhärenen Zelle zu ermitteln wird ein mathematisches Modell genutzt¹⁶⁰, welches das isotrope Material der EZM als Feder mit einer bestimmten Federkonstante beschreibt. Diese Konstante ist proportional zum Youngschen Modul. Demnach ist es Zellen möglich die Substratfestigkeit wahrzunehmen, indem sie über die Adhäsionskontakte einen Zug ausüben. Über diese, durch die mechanischen Komponenten des Zytoskeletts generierte, Zugkraft können Zellen somit ihr Umfeld deformieren¹⁵⁸. Folglich sind sowohl die Anordnung der Zytoskelettkomponenten (z.B. Aktin) als auch die Zellausbreitung und Formierung der Fokalkontakte stark durch die Elastizität (Festigkeit) des Substrats beeinflusst^{160,161}.

Das hier entwickelte Modellsystem bietet die Möglichkeit verschiedene adhäsionsrelevante Parameter zu variieren und somit die Zellantwort auf unterschiedlich kombinierte Zusammenstellungen von Parametern, wie Elastizität (mechanischer Einfluss), Angebot unterschiedlicher Linkermoleküle (chemischer Einfluss), sowie variierende Abstände der Linkermoleküle (struktureller Einfluss) zu untersuchen. Diese Faktoren bieten interessante Einblicke und Möglichkeiten zur Untersuchung unterschiedlicher Zellsysteme, wie beispielsweise der in dieser Arbeit vorgestellten Malaria Parasiten (*Plasmodium* Sporoziten).

2.6 Malaria und biophysikalische Eigenschaften des Malaria Parasiten

2.6.1 Malaria

Malaria ist eine der häufigsten Vektor-Krankheiten weltweit. Menschen werden seit mehr als 6000 Jahren von Malaria befallen. Schätzungen, welche auf genetischen Analysen beruhen, datieren das Auftreten von Malaria sogar auf einen Zeitraum vor 100000 Jahren zurück¹⁶². Malaria wird durch den einzelligen Parasiten des Stammes *Plasmodium* verursacht. Die Haupterreger der menschlichen Malaria sind *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax*. Sie verursachen die typischen Symptome wie Fieber, Schüttelfrost, Gelenkschmerzen, Erbrechen, Hämoglobinurie und Fieberkrämpfe. Weitere Spezies, wie *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae*, sind ebenfalls humaninfektiös, im Gegensatz zu Ersteren jedoch nicht tödlich. 1880 konnte Charles L.A. Laveran (1845-1922) bakterielle Ursachen für eine Malariaerkrankung ausschließen. Er beobachtete den *Plasmodium* Parasiten erstmals in den roten Blutzellen infizierter Menschen und erhielt 1907 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Der Mediziner Sir Ronald Ross (1857-1932) bewies bereits 1898, dass Malaria durch Moskitos übertragen wird. Er konnte die Übertragung von Malaria durch eine bestimmte Moskito Spezies (*Anopheles*) auf Vögel nachweisen. Insbesondere schaffte er es, Malaria Parasiten aus der Speicheldrüse von Moskitos zu isolieren, welche zuvor eine Blutmahlzeit von infizierten Vögeln zu sich genommen hatten. Hierfür bekam er bereits 1902 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin¹⁶³. Eine außergewöhnliche Therapie entwickelte der österreichische Psychiater Julius Wagner-Jauregg (1857-1940) zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts. Er infizierte absichtlich Patienten, die unter - durch Neurosyphilis verursachte - Geisteskrankheit litten, mit Malaria. Das resultierende Fieber führte zu einer deutlichen Verbesserung der Symptome der Patienten, welche diese Behandlung überlebten. Diese Behandlungsform wurde als Therapie von Syphilis anerkannt. Erst die Entdeckung von Antibiotika gegen Syphilis machte diese raue Methode überflüssig. Julius

Wagner-Jauregg erhielt 1927 als erster von bisher insgesamt lediglich zwei Psychiatern den Nobelpreis für Physiologie und Medizin¹⁶⁴.

Derzeit ist Malaria in den meisten tropischen und subtropischen Regionen Amerikas, in Afrika, Asien und sogar in einigen Teilen Europas verbreitet. Laut Bericht der WHO (World Health Organisation) gibt es jährlich 500 Millionen Neuinfektionen, von denen 3 Millionen, meist bei Kindern aus Schwarzafrika, tödlich verlaufen^{165,166}. Eines der ältesten Mittel gegen Malaria ist Chinin, welches aus der Rinde des Chinarindenbaums gewonnen wird. Erstmals wurde Chinin 1820 durch die französischen Chemiker Pierre Joseph Pelletier (1788-1822) und Joseph Bienaim Caventou (1795-1877) isoliert und identifiziert¹⁶⁷. Heutzutage sind einige Medikamente zur Behandlung und Prophylaxe bekannt, wie Chloroquin, Mefloquin, Chinin und Artemisinin-haltige Präparate. Aufgrund der zunehmenden Resistenz des Erregers wird die medikamentöse Behandlung jedoch immer problematischer. Dies äußert sich bereits in einem Anstieg der Todeszahlen¹⁶⁸. Ein Impfstoff konnte bisher nicht entwickelt werden. Umso bedeutender ist es, neue Möglichkeiten im Kampf gegen die Erkrankung durch Malaria zu finden. Zur Erforschung des Malaria Parasiten wurde in dieser Arbeit mit dem Nagetier Malaria Parasiten *Plasmodium berghei* gearbeitet. Dieser stammt aus den Wäldern Zentralafrikas und befällt dort innerhalb seines Lebenszyklus Waldratten (*Grammomys surdaster*) und die *Anopheles durenii* Mücke¹⁶⁹. Da die Morphologie und Biologie des *Plasmodium berghei* der des Menschen befallenden Parasiten ähnelt^{170 - 172}, ist es möglich den kompletten Lebenszyklus des *Plasmodium berghei* im Labor zu erhalten und ihn zu untersuchen. So stellt dieser Parasit, unter Ausschluss einer Ansteckungsgefahr für den Menschen, ein gutes Modellsystem dar.

2.6.2 Biologie und Lebenszyklus des Malaria Parasiten

Der Lebenszyklus des *Plasmodium* Sporozoiten ist komplex und umfasst verschiedene Stadien innerhalb des Wirbeltier-Wirtes (z.B. Mensch, Ratte...) und des Insekts (*Anopheles* Mücke). Während dieser Stadien ändert sich das morphologische Erscheinungsbild des Parasiten mehrmals (Abbildung 31a)¹⁷³. Die Malaria Parasiten werden durch den Biss einer weiblichen *Anopheles* Mücke übertragen. Hierbei werden die Sporozoiten während der Blutmahlzeit unter die Haut eines Wirbeltier-Wirtes injiziert (Abbildung 31a (1)). Die Parasiten passieren das Hautgewebe und dringen anschließend in ein Lymph- oder Blutgefäß ein, um in den Blutkreislauf zu gelangen¹⁷⁴. In diesem lassen sie sich passiv bis zur Leber mitschwemmen^{175,176}. Dort durchwandern sie mehrere Schichten von Leberepithelzellen (Hepatozyten) (Abbildung 31a (2)) und dringen schließlich unter Bildung einer parasitophoren Vakuole in eine Leberzelle ein. Hier transformieren und replizieren sie sich mittels asexueller Zellteilung zu mehreren tausend Merozoiten. Anschließend werden diese in Form von Vesikeln (Merosomen) in den Blutkreislauf abgegeben. Dies geschieht zwischen zwei und sechzehn Tage nach Injektion durch den Moskito (Abbildung 31a (3))¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Jeder dieser Merozoiten kann nun in einem mehrstufigen Prozess ein rotes Blutkörperchen (Erythrozyt) befallen¹⁸⁰. Innerhalb dieser roten Blutzelle kommt es erneut zur Zellteilung (Schizogonie), was zu einem Proteinabbau des zellulären Hämoglobins führt. Durch mehrmaliges Freisetzen von Merozoiten und erneutes Eindringen dieser in rote Blutzellen (RBZ) (Abbildung 31a (4)) kommt es zum Absterben der Zellen. Fragmente dieser toten Zellen können nun eine Verstopfung kleiner Gefäße verursachen. Die Immunantwort auf die Zellteile ruft eine allgemeine Entzündungsreaktion hervor. Diese Immunreaktion bewirkt das hohe Malaria-symptomatische Fieber. Nach einigen Zyklen der Replikation, differenzieren einige Merozoiten zur geschlechtlichen Form des Parasiten (Abbildung 31a (5)). Diese sogenannten Mikro- und Makrogametozyten besitzen keine Auswirkung auf den menschlichen Wirt, sind jedoch ausschlaggebend für die

erneute Aufnahme durch die *Anopheles* Mücke. Nach Einsaugen durch die Mücke bilden die Makrogametozyten (weibliche Geschlechtsform) Makrogameten aus und die Mikrogametozyten (männliche Geschlechtsform) produzieren Mikrogameten, welche sich im Mitteldarm des Moskitos zu mehreren Flagellaten entwickeln. Durch Verschmelzen der Gameten bilden sich sogenannte Ookinete (hüllenlose Eizelle), welche sich nach Wanderung durch die Mitteldarmwand in eine Oozyte (unreife Eizelle) weiterentwickelt (Abbildung 31 (6)). Innerhalb dieser Oozyte werden nun die Sporozoiten produziert und nach Aufreißen der Oozyte freigesetzt. Nun bewegen sie sich durch die Hämolymphe und befallen die Speicheldrüse des Moskitos (Abbildung 31 (7)), wo sie auf eine erneute Übertragung auf einen Wirt warten und somit den Lebenszyklus wiederholt durchlaufen^{181, 182}. In dieser Arbeit wurden *Plasmodium berghei* Sporozoiten verwendet, welche kontinuierlich GFP (green fluorescent protein) exprimieren. Dies ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Parasiten im infizierten Mitteldarm und in der Speicheldrüse der Mücke (Abbildung 31b-d).

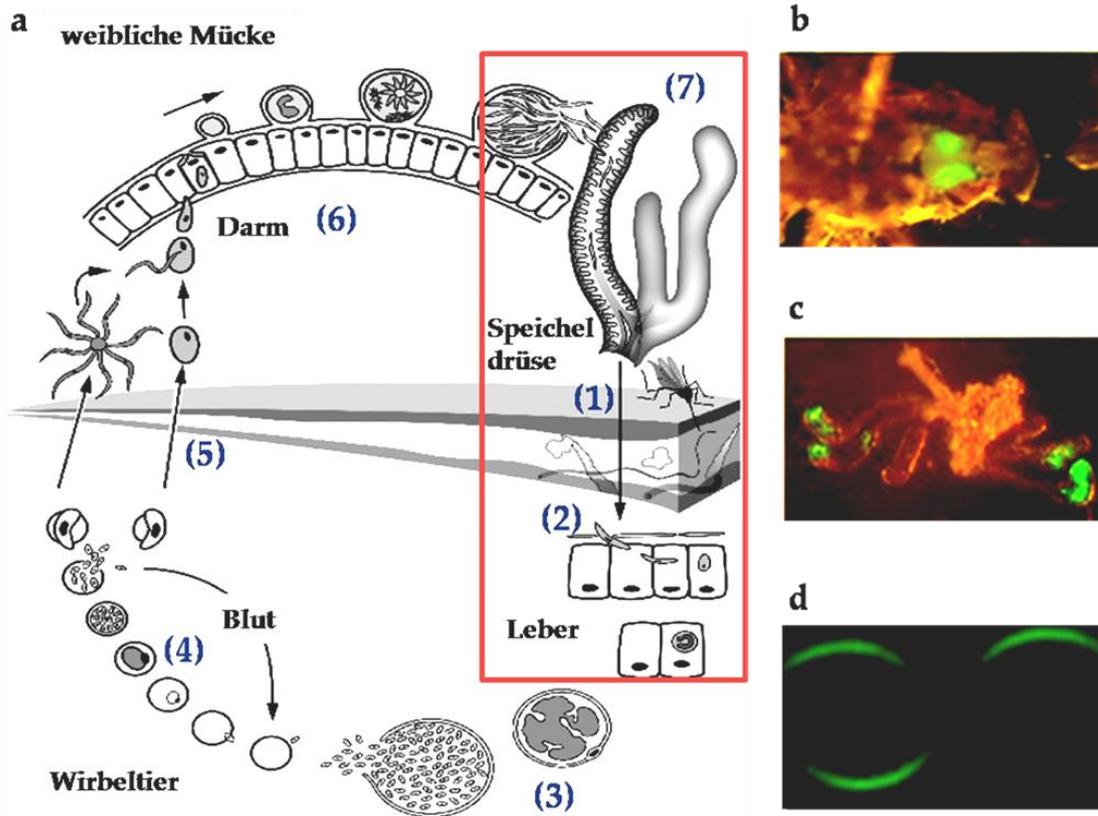


Abbildung 31: a) Der Lebenszyklus des *Plasmodium* Parasiten. Die Parasiten werden durch eine infizierte Mücke (*Anopheles*) übertragen (1). Nach Passieren der Haut, wandern die Parasiten zur Leber und dringen dort in Hepatozyten (Leberzellen) ein (2). Nach folgender Entwicklung und Replikation werden Merozoiten in den Blutstrom freigesetzt und befallen dort rote Blutzellen (3). Nach mehreren Zyklen der Vermehrung innerhalb roter Blutzellen (4), differenzieren die Merozoiten in die geschlechtlichen Formen des Parasiten. Diese werden im Folgenden erneut durch eine Mücke aufgenommen (Blutmahlzeit) (5). Es folgt die Ausbildung von Oozyten an der äußeren Mitteldarmwand (6). Die herangereiften Sporozoiten werden in die Hämolymphe entlassen und wandern nun in die Speicheldrüse (7). In dieser Arbeit wurde mit Sporozoiten gearbeitet, die sich in dem durch die rote Box gekennzeichneten Stadium befanden. Die Bilder b-d zeigen GFP-exprimierende Plasmodien. b) Fluoreszenz innerhalb einer infizierten Mücke *in vivo*, c) innerhalb einer extrahierten Speicheldrüse d) freigelegte Sporozoiten¹⁸³.

2.6.3 Zytoskelett und Motilität von *Plasmodium* Sporozoiten

Plasmodium Sporozoiten sind längliche, klar polarisierte Zellen, welche zu den invasiven Stadien des Malaria-Erregers gehören. Ihre längliche, gekrümmte Form (Länge ~10 µm, Dicke ~2 µm) wird durch Mikrotubuli geprägt, die unterhalb der Pellikula länglich verlaufen und an einem anterioren, polaren Ring befestigt sind. Gebildet wird die Pellikula durch eine äußere Plasmamembran und zwei dicht zusammenliegende, innere Membranen, dem sogenannten *inner membrane complex* (IMC)¹⁸⁴. Der Apikalkomplex (anteriorer Zellpol) enthält Mikronomen und sekretorische Vesikel (Rhoptrien), welche nur in den invasiven Stadien vorhanden sind. Hier sind sie an der Bindung und Invasion der Wirtszelle beteiligt.

Wie in Kap. 2.6.2 gezeigt, bezeichnen Sporozoiten die Stadien, welche den Wirtswechsel durchleben (Abbildung 31 roter Kasten). Die Tatsache, dass sie zwei völlig unterschiedliche Wirtsorgane durchdringen, zeichnet sie mit einzigartigen Fähigkeiten aus. In der Mücke müssen die Sporozoiten die Speicheldrüse erreichen, in welcher sie sich langsam bewegen. Nach Injektion unter die Haut erhöhen sie ihre Geschwindigkeit und dringen nach Durchqueren des Endothels in die Lymph- und Blutgefäße ein, durch welche sie zur Leber transportiert werden^{185, 186}. Dort angekommen durchqueren sie mehrere Zellen (Hepatozyten) bevor sie eine befallen und sich in dieser weiterentwickeln. Dieser Facettenreichtum der Sporozoiten-Fortbewegung bietet neue Angriffspunkte im Kampf gegen Malaria¹⁸⁷.

Generell lassen sich zwei Arten der substratabhängigen Fortbewegung unterscheiden. Die amöbenartige Bewegung, bei der es zur Veränderung der Zellmorphologie kommt, und die Gleitbewegung (*gliding motility*), bei welcher es zu keiner sichtbaren Veränderung der Zellform kommt. Die erstgenannte Bewegungsform ist typisch für Amöben und andere Zelltypen, wie Neuronen und Fibroblasten¹⁸⁸, während die Gleitbewegung bei Throphozoiten und Sporozoiten zu beobachten ist¹⁸⁹. Hier scheinen im Gegensatz zur amöbenartigen Fortbewegung keine ausgeprägten Filopodien-Strukturen, sondern lediglich kleine Aktin-

Fragmente eine Rolle bei der Bewegung zu spielen. Bisher war es aufgrund ihrer sehr geringen Konturlänge von ca. 100 nm¹⁹⁰ nicht möglich, die Aktin-Fragmente durch konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie darzustellen. Experimente unter Verwendung von Cytochalasin D (Aktin-Polymerisation hemmende Substanz) zeigten jedoch eine Hemmung der Motilität^{191,192} (Abbildung 32, rechts). Der Einsatz einer Aktin-Depolymerisation hemmenden Substanz, wie Jasplakinolid^{193, 194} (Abbildung 32, links) lässt ebenfalls vermuten, dass die Polymerisation von Aktin ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist¹⁹⁵.

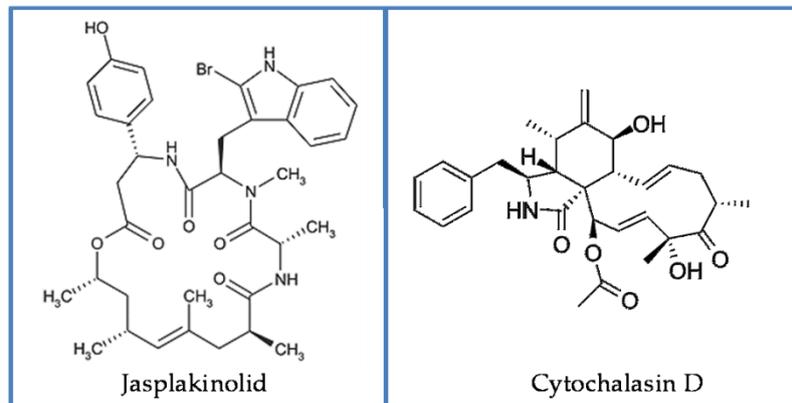


Abbildung 32: Beeinflussende Wirkstoffe der Aktinpolymerisation. Jasplakinolid fördert die Polymerisation (hemmt Depolymerisation) von Aktin (links). Cytochalasin D hemmt die Polymerisation von Aktin (rechts).

Während des gesamten Sporozoiten-Stadiums spielen zwei multifunktionale Moleküle eine wichtige Rolle - CSP und TRAP. Das CSP (*circumsporozoite protein*) gilt als Hauptoberflächenprotein von Speicheldrüsen-Sporozoiten¹⁹⁶. Das Protein wird hauptsächlich in den Mikronemen gespeichert, dann an die Zelloberfläche transportiert und am hinteren Ende abgespalten. Es ist über Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) mit der Zellmembran verbunden¹⁹⁷. CSP vermittelt während der Leberzelleninvasion die Bindung zwischen Sporozoiten und Hepatozyten¹⁹⁸, sowie die Adhäsion der Sporozoiten an die Speicheldrüsenzellen des Moskitos^{199,200}. Ein weiteres essentielles Protein ist das TRAP (*thrombospondin-related*

anonymous protein). Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein des Typs I. Es ist ungleichmäßig über die Sporozoiten verteilt²⁰¹ und häuft sich beim Kontakt mit der Wirtszelle am hinteren Pol des Sporozoiten an²⁰². Die extrazelluläre Domäne des TRAP besteht aus zwei adhäsiven Domänen, der A-Domäne des von-Willebrand-Faktors und des *thrombospondin type I repeats* (TSR)²⁰⁰. Die Proteine der TRAP Familie werden nach ihrer Transmembranarchitektur zusammengefasst. In *Plasmodien* wurden sechs Formen gefunden: TRAP, CTRP, PTRAMP, MTRAP, TLP und S6, wobei TLP (TRAP-Like-Protein) und S6 (Sporozoite Induced Protein) noch nicht vollständig charakterisiert sind²⁰³. Abbildung 33 zeigt den Aufbau der oben aufgezählten Proteine.

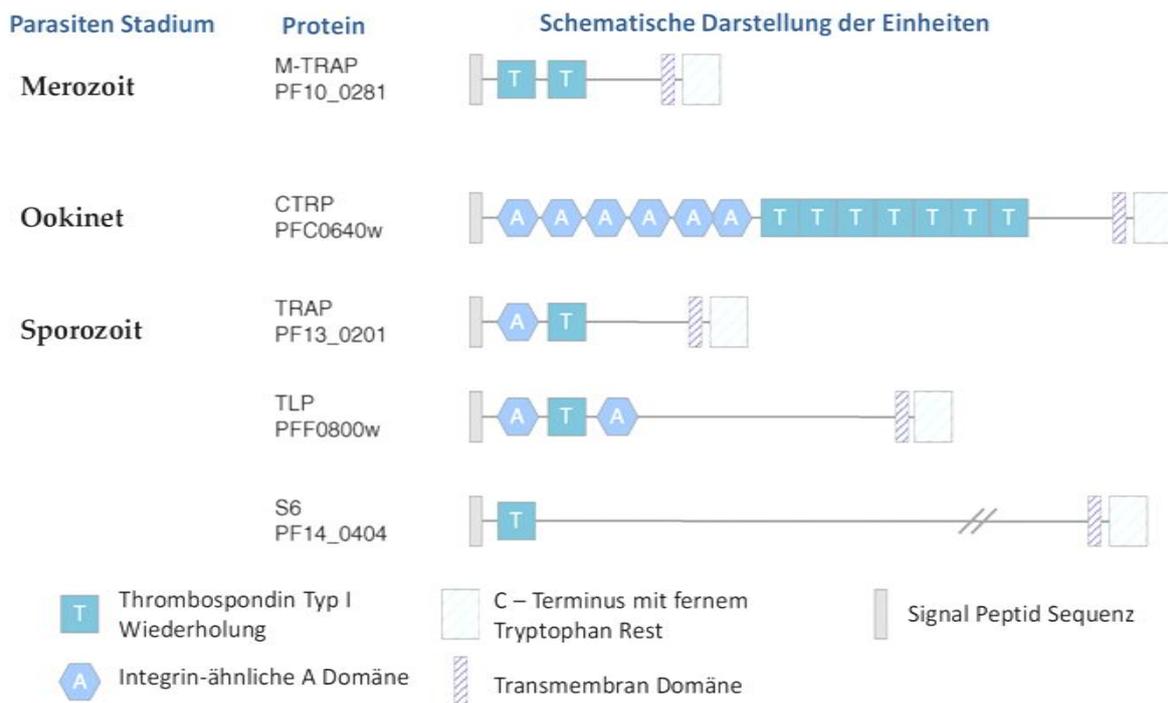


Abbildung 33: Schematische Darstellung des Aufbaus der Proteine der TRAP-Familie²⁰⁴⁻²⁰⁶.

Die Gleitbewegung (*gliding motility*) auf festem Substrat und durch Gewebe, als auch die Invasion von Wirtszellen, werden durch den gleichen zytoplasmatischen Motor gesteuert^{207,208}. Eine schematische Darstellung des Modells der molekularen Motor-maschinerie wird in Abbildung 34 aufgeführt. Das Myo A (Myosin) des hier

gezeigten Myosin-Aktin Komplexes bildet eine eigene Klasse, welche nur in *Apikomplexa* zu finden ist²⁰⁹. Myo A ist über MTIP (*Myo A tail interacting protein*) und MDP (*Myo A docking protein*) an die äußere Membran des IMC (*inner membrane complex*) gebunden. Im kortikalen Raum wechselwirkt es mit filamentösem Aktin (F-Aktin). Durch Proteine der TRAP-Familie wird der intrazelluläre Aktin-Myosin Komplex mit dem extrazellulären Substrat gekoppelt^{210,211}. Hierbei ist das TRAP über die zytoplasmatische Einheit an Aldolase gebunden, welches über F-Aktin mit der Motormaschinerie verknüpft ist^{212,213}. Bei der Gleitbewegung des Sporozoiten, wird somit das TRAP durch den Myosin-Motor zum posterioren Pol des Sporozoiten gezogen, wodurch eine Vorwärtsbewegung des Sporozoiten verursacht wird¹⁹⁵.

In vitro zeigen *Plasmodium* Sporozoiten eine kreisförmige Fortbewegung. Die Kreise umfassen hierbei einen Durchmesser von ca. 10 μm ^{175,214}. Auffallend hierbei ist die Bewegungsrichtung. Nahezu alle Sporozoiten gleiten gegen den Uhrzeigersinn. Bei dieser Kreisbewegung bilden die Sporozoiten mehrere Adhäsionsstellen aus²¹⁵. Neben dieser zyklischen Bewegungsform wird ebenfalls eine weitere Form der Bewegung beobachtet. Hierbei sind die Sporozoiten an einem Ende gebunden und bewegen das andere Ende aktiv in einer Art „Wippbewegung“. Dieses Bewegungsmuster wird als „*waving*“ bezeichnet und dient vermutlich dazu eine weitere Adhäsionsstelle zu finden und auszubilden. Eine Sequenz der Bilder dieser Bewegungsformen ist in Abbildung 35 dargestellt.

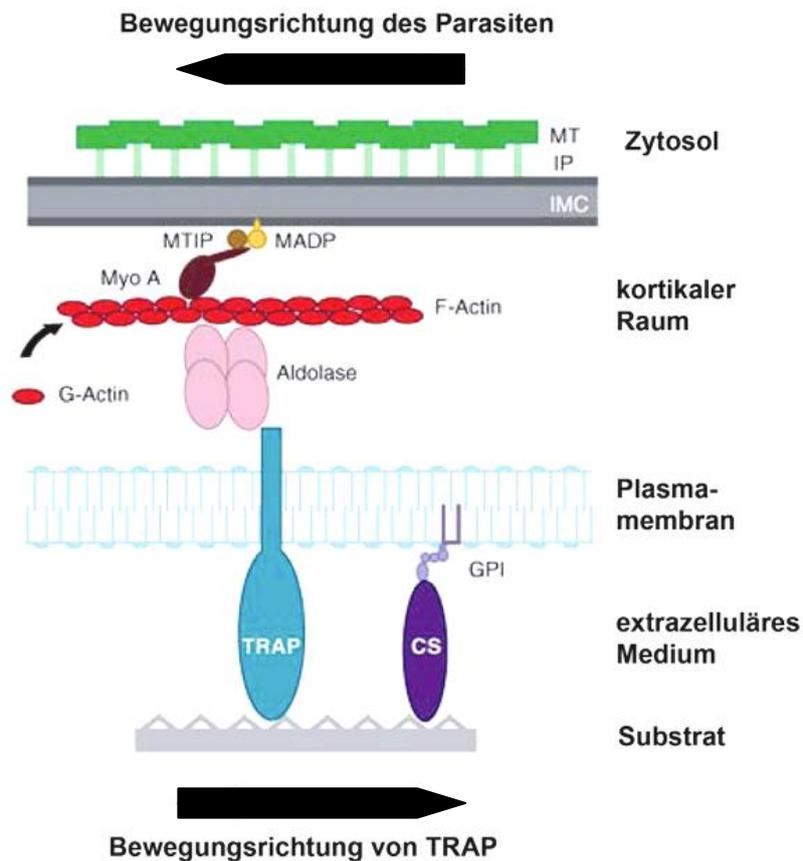


Abbildung 34: Modell der molekularen Bewegungsmechanik.

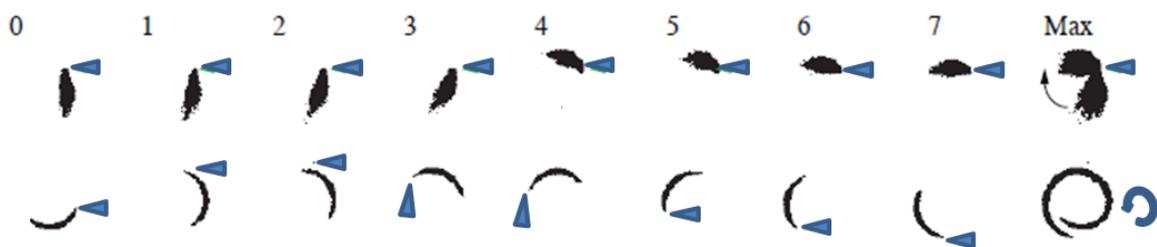


Abbildung 35: Darstellung einer Bildsequenz der zwei bekanntesten Bewegungsmuster von *Plasmodium* in vitro. Die obere Zeile zeigt die Bewegungsform eines Sporozoiten, welche als „waving“ bezeichnet wird. Die gebundene Seite ist durch das blaue Dreieck gekennzeichnet. Der Sporozoit in der unteren Zeile stellt eine zyklische Bewegung gegen den Uhrzeigersinn dar. Die „Vorderseite“ des Sporozoiten und somit die Bewegungsrichtung sind auch hier durch ein blaues Dreieck markiert. Rechts ist jeweils die Gesamtprojektion der Bilder zu sehen. Für die Abbildung wurden die Aufnahmen invertiert. (Zur Verfügung gestellt von Dr. Friedrich Frischknecht).

Bis zur Beobachtung von Bewegungsformen der Sporozoiten *in vitro* durchlaufen diese zunächst mehrere Schritte. Zu Beginn des Experiments schwimmen die Parasiten gewöhnlich im Medium. Bei Annäherung an die Oberfläche bilden sie zunächst einen ersten Kontakt und schließlich auf einer Seite eine Adhäsionsstelle aus. Häufig folgt nun das oben beschriebene *waving* bevor sich am hinteren Ende des Sporozoiten eine zweite Adhäsionsstelle ausprägt. Dieser zweite Kontakt kann durch externe Kräfte, wie laminare Strömung, welche den Parasiten nah an die Oberfläche drückt, hervorgerufen werden. Im Folgenden bewirken leichte Streckbewegungen des Parasiten eine Annäherung des gesamten Sporozoiten zum Substrat (tertiäre Adhäsion), wodurch die Gleitbewegung ermöglicht wird²¹⁶ (Abbildung 36). Der Parasit bildet also spezifische Adhäsionskontakte zum Substrat aus²¹⁵. Anders als bei migrierenden Tierzellen, werden die Adhäsionskontakte des Parasiten bei dessen Bewegung mitgenommen. Der Parasit beschleunigt seine Bewegung deutlich während eines kurzzeitigen Ablösens eines Adhäsionskontaktes. Die Gesamtgeschwindigkeit des Parasiten wird somit durch das Zusammenspiel der Bildung von Adhäsionskontakten und das Lösen der Kontakte bestimmt²¹⁵. Diese Rate ist interessanterweise abhängig von der Aktindynamik. Partielle Depolymerisation von Aktinfilamenten mittels Cytochalasin D führt zur Verlangsamung der Bewegung bei gleichzeitig schnellerer Adhäsionsablösung und geringerer Kräfteauswirkung des Parasiten auf das Substrat²¹⁵. Vermutlich sind unterschiedliche Oberflächenproteine des Parasiten an der Bildung der Adhäsionskontakte zum Substrat beteiligt. Jedoch ist nur sehr wenig über ihre genaue Bedeutung in Bezug auf die Adhäsion, mögliche kooperative Effekte und die subzelluläre Lokalisation bekannt^{215,216}.

Dieses Verhalten der Sporozoiten und die Charakteristiken der Gleitbewegung werden in dieser Arbeit unter Verwendung vielfach modifizierbarer Oberflächensysteme untersucht.

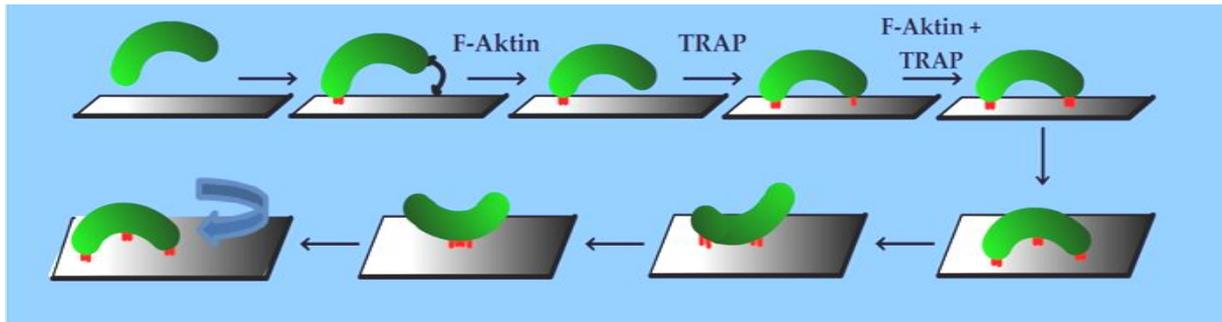


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Adhäsionsschritte eines *Plasmodium* Sporozoiten vor Beginn der zyklischen Gleitbewegung. Es ist bekannt, dass Aktin und TRAP eine wesentliche Rolle bei der Adhäsion und Fortbewegung spielen. Die genaue Rolle einzelner Proteine ist jedoch noch nicht bekannt.

3 Materialien und Analysemethoden

3.1 Verwendete Chemikalien

Aufgrund der Luft- und Feuchtigkeitsempfindlichkeit einiger synthetisierter Verbindungen wurden die Anbindung der PEGs und die Polymerisationen der Hydrogele unter Inertgasatmosphäre durchgeführt (Stickstoff der Firma Messer Griesheim, Qualität 4.6).

Die verwendeten Lösungsmittel wurden über einem Molekularsieb 3 Å der Firma Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe) getrocknet und aufbewahrt.

Die Diblock-Copolymere wurden von Polymer Source Inc. und PBS-Tabletten (phosphate buffered saline), DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium), FBS (fötale Rinderserum) und L-Glutamin von GIBCO erworben.

Toluol (p.A.), 30%iges Wasserstoffperoxid (med. reinst), 96%-ige Schwefelsäure (p.A.), Aceton (p.A.) und Triton X-100 wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Polyethylenglykol-Diacrylat 700 und der Initiator 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon sowie Tetrachlorgoldsäure ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{HCl}$) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) erworben.

Das zyklische Oligopeptid RGD wurde von Prof. Kessler *et al.* (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

Bovine Serum Albumine (BSA) wurde von Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, RPMI von PAA (Pasching, Österreich), HS-(CH_2)₁₁-EG₃-Biotin von Prochimia (Sopot, Polen) und Paraformaldehyd (PFA) von Riedel de Haen (Seelze, Deutschland) bezogen.

Heparin wurde bei Ratiopharm (Ulm, Deutschland), Laminin, Fibronectin, Poly-L-Lysin bei Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland), Kollagen Typ I bei Biosciences (BD, Heidelberg), Fötale Rinderserum (FBS) wurde bei Invitrogen (Karlsruhe,

Deutschland), Cytochalasin und Jasplakinolid wurden bei Merck Biosciences (Nottingham, UK) bestellt.

3.2 Verwendete Materialien

Die verwendeten Glassubstrate wurden von der Firma Carl Roth GmbH (Deckgläschen 20x20 mm, 24x24 mm und 24x60 mm), von der Firma Fiberlogix (Mikrofasern; Durchmesser: 80, 125 μm) bezogen und über die Firma OptoPrim bestellt.

Zur Polymerisation wurde eine UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 365 nm verwendet.

3.3 Verwendete Geräte und Methoden

3.3.1 Sputter Coater

Zum Bedampfen der Glasproben (Deckgläschen, Mikrofasern) mit Graphit wurde das MED 020 Coating System bzw. das MCS 010 und zum Einfrieren der Hydrogele in flüssigem Stickstoff das System VCT 100 der Firma Bal-Tec verwendet.

Prinzip:

Der Sputter Coater erzeugt im Hochvakuum durch Kathodenzerstäubung eines Graphitfadens eine dünne Graphitschicht auf der Oberfläche der beispielsweise nanostrukturierten Glasprobe. Dieses Aufbringen einer leitenden Schicht ist notwendig, um die Oberflächen ohne Aufladungseffekte im Rasterelektronenmikroskop untersuchen zu können. Dabei ist von Vorteil, dass der dünne Graphitfilm nur ein geringes Hintergrundsignal erzeugt.

3.3.2 Plasmasysteme

Plasmabehandlung wurde im Plasma System 100-E der Firma TePla (Bedienung bei 0,4 mbar, 150 Watt, 45 min) bzw. im Plasma System 100 der Firma PVA TePLA (Bedienung bei 0,3 mbar, 200 Watt, 45 min) bewerkstelligt. Verwendete Gase wurden von der Firma Messer Griesheim (Wasserstoff, Qualität 5,0; Sauerstoff, Qualität 4,5; Argon Qualität 4,8) bzw. von der Firma Westfalen (Wasserstoff, Qualität 5,0) bezogen.

Prinzip:

Das Plasma wird durch Mikrowellenentladung bei einem bestimmten Gasdruck generiert. Die dabei beobachtete Glühentladung wird durch die Anregung von Elektronen bedingt, welche durch Photoemission im ultravioletten und sichtbaren Bereich wieder in ihren Grundzustand zurückkehren. Die Diffusion der so erzeugten Ionen und Neutralteilchen zur Substratoberfläche bewirkt dort chemische Reaktionen. Des Weiteren werden durch die kinetische Energie der Ionen Teile der Oberfläche herausgeschlagen. Die bei diesem Vorgang gebildeten ionischen sowie auch neutralen, flüchtigen Reaktionsprodukte werden durch den Gasstrom entfernt. In dieser Arbeit wurden neben flachen Glassubstraten auch sehr fein geätzte, leichte Glasfasern verwendet. Für letztere wurde ein mit Kerben versehener Aluminiumhalter angefertigt. Dieser ermöglicht es, die Fasern freitragend von allen Seiten dem Plasma auszusetzen. Die sehr dünnen Fasern mit Durchmessern bis $\sim 10 \mu\text{m}$ wurden zusätzlich mit Aluminiumschienen fixiert (Abbildung 37).

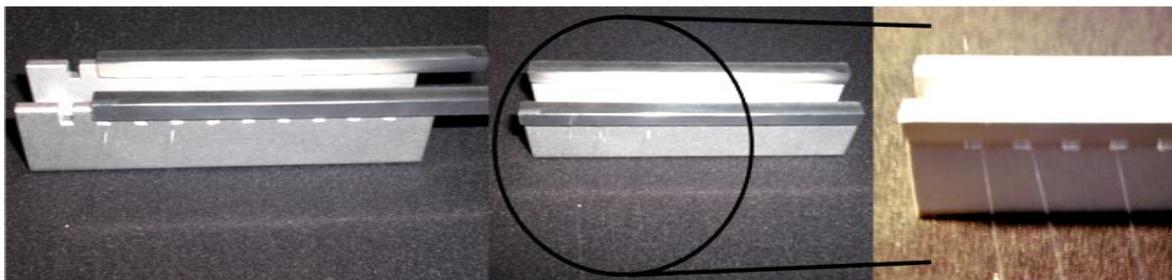


Abbildung 37: Aluminiumhalter mit Kerben und Aluminiumschienen zur Fixierung der Fasern während des Plasmaprozesses.

3.3.3 Kritisch-Punkt-Trockner

Zur Vorbereitung biologischer Proben für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurde das Kritisch-Punkt-Trocknersystem (CPD 030) der Firma Bal-Tec verwendet, um den Substraten jegliche Feuchtigkeit zu entziehen.

Prinzip:

Das Prinzip des Kritisch-Punkt-Trocknens nutzt die Eigenschaft, dass beim Überschreiten des kritischen Punktes eines Mediums keine Phasengrenze mehr zwischen flüssig und gasförmig existiert (Abbildung 38 Kurve A, B). Da sich das Medium in diesem Fall im überkritischen Zustand befindet, wird ein direktes Verdampfen der Flüssigkeit und somit eine Beschädigung der biologischen Probe vermieden. Die Trocknung erfolgt vollständig und sehr schonend. Der kritische Punkt von Wasser liegt bei einer Temperatur von 374 °C und einem Druck von 221 bar²¹⁷, wodurch es aufgrund der hohen Temperatur zur Beschädigung der Präparate kommen würde. Aus diesem Grund setzt man im Austausch Kohlenstoffdioxid ($T_{\text{krit}} = 31^\circ\text{C}$, $p_{\text{krit}} = 73 \text{ bar}$) ein (Abbildung 38).

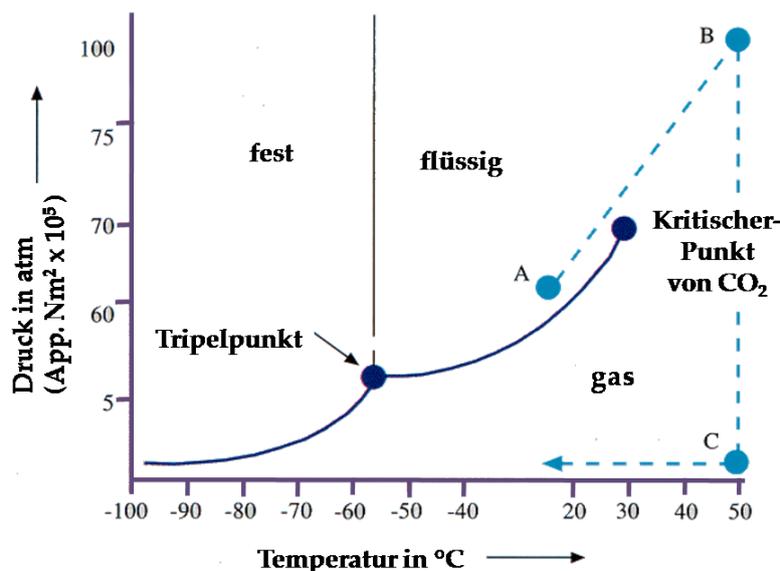


Abbildung 38: Phasendiagramm von CO₂; $T_{\text{krit}} = 31^\circ\text{C}$, $P_{\text{krit}} = 73 \text{ bar}$ ²¹⁷.

3.3.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Mikroskop der Firma Zeiss Typ Ultra 55 mit Cryo-Einheit der Firma Bal-Tec bzw. der Firma LEO Typnummer 1530 bei Beschleunigungsspannungen von 3 bis 5 kV und einem Druck unter 5×10^{-6} mbar durchgeführt.

Prinzip:

Die Rasterelektronenmikroskopie basiert auf der Abrasterung der Probenoberfläche durch einen feingebündelten Elektronenstrahl. Dieser wird in einer Elektronenquelle, die meist aus einer thermischen Kathode (haarnadelförmig gebogener Wolframdraht mit Wehnelt Elektrode) besteht, erzeugt. Die Elektronen werden durch ein elektrisches Feld zur Anode hin beschleunigt und weisen somit die zur Abbildung und Analyse erforderliche Primärenergie auf. Durch Elektronenlinsen wird der Strahl mit einem geringen Durchmesser von einigen Nanometern auf der Probenoberfläche abgebildet. Aufgrund von Linsenfehlern der Elektronenlinsen können nur sehr feine Strahlen (Öffnungswinkel einige 1/10 Grad) zur Abbildung genutzt werden. Diese Voraussetzung wird durch die Einbringung von Aperturblenden in den Strahlengang erfüllt. Der Strahldurchmesser ist ebenfalls von der Höhe der Strahlströme abhängig. So sind beispielsweise zur Durchführung analytischer Messungen höhere Strahlströme erforderlich, wodurch der Strahldurchmesser zunimmt und sich gleichzeitig das erreichbare Auflösungsvermögen verschlechtert. Ein weiterer Vorteil des schlanken abbildenden Elektronenstrahls liegt darin, dass sich sein Durchmesser nur sehr geringfügig mit der Höhe über der Probe ändert. Proben mit Objektdetails in unterschiedlicher Höhe werden überall von einem Strahl konstanten Durchmessers abgerastert und somit scharf abgebildet. Das Rasterelektronenmikroskop ermöglicht eine Auflösung bis in die Nanometerskala. Der auf die Probe auftreffende Strahl löst unterschiedliche Signale aus (SE, BSE, EDX, Abbildung 39), welche durch spezifische Detektoren

registriert werden. Durch einen Rastergenerator und Ablenkspulen wird der Elektronenstrahl in einem rechteckigen Feld zeilenförmig über die Probe geführt und synchron hierzu ein Schreibstrahl in der Bildröhre. Probenbereiche, die starke Signale abgeben, erscheinen dabei hell, während geringe Signale dunkler abgebildet werden.

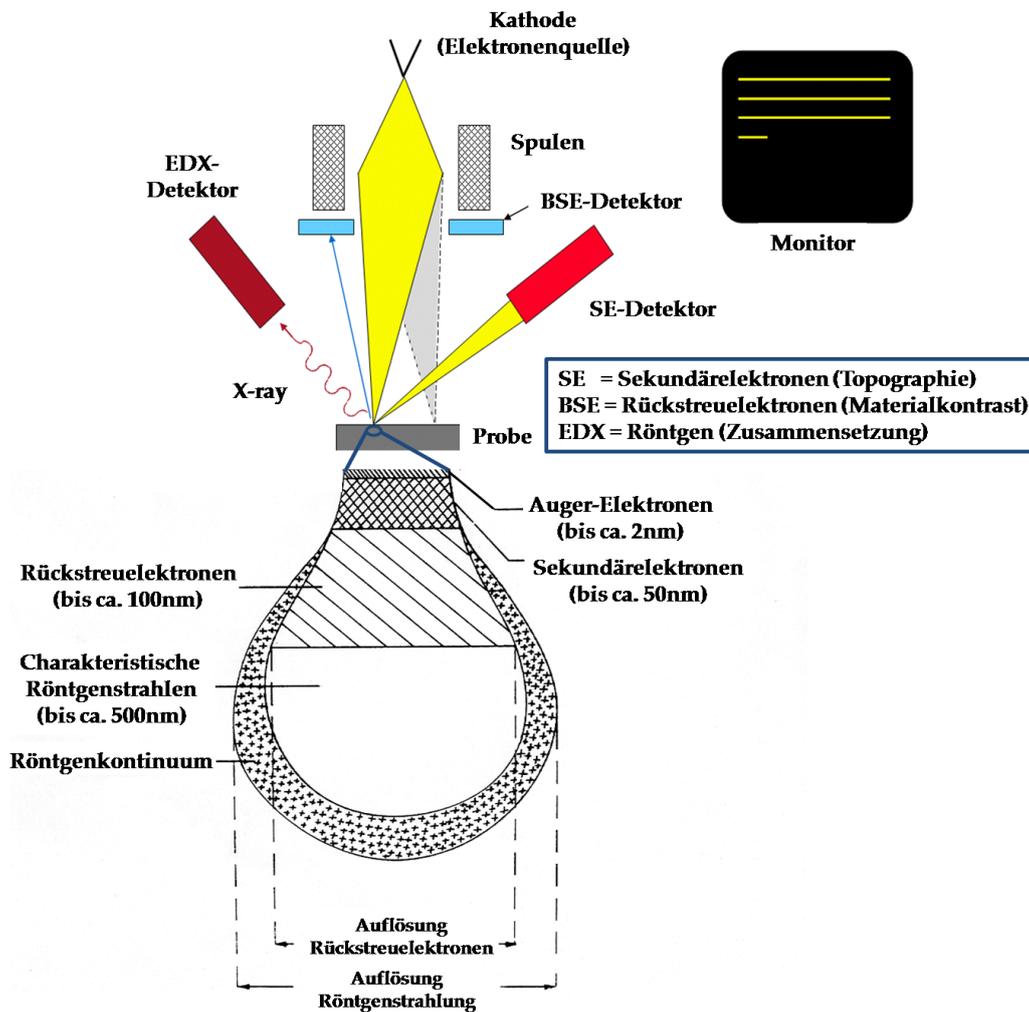


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Signale, die im REM entstehen und detektiert werden.

Die hochenergetischen Elektronen des Primärstrahls dringen in die Probe ein und treten dort mit dieser in Wechselwirkung (Abbildung 39). Elektronen, welche durch elastische Stöße von den Probenatomen abgelenkt und reflektiert werden, bezeichnet

man als Rückstreuielektronen (BSE=backscattered electrons). Sie besitzen eine ähnlich hohe kinetische Energie wie die einfallenden Elektronen. Durch Detektion der Rückstreuielektronen mittels InLens-(BSE-) Detektor können Materialkontraste der Probe gut sichtbar gemacht werden. BSE werden verstärkt von Atomen mit großer Ordnungszahl rückgestreut, wodurch diese heller erscheinen. Die sogenannten Sekundärelektronen (SE) entstehen durch Herausschlagen von Probenelektronen der Valenzschalen durch die Primärelektronen. Hierbei kommt es zum Energieverlust der Sekundärelektronen gegenüber den Primärelektronen. Die Sekundärelektronen werden nochmals in SE1, welche die Probe in der Einstrahlzone verlassen und SE2-Elektronen aufgeteilt. Die SE2-Elektronen werden durch Mehrfachstreuung abgelenkt und verlassen die Probe in einem gewissen Abstand zur Einstrahlzone. Durch den SE2-Detektor, welcher sich ca. in einem 80 °-Winkel zum Primärstrahlengang befindet, werden die SE2-Elektronen detektiert und geben somit Bildinformationen über die topographische Beschaffenheit der Probe.

Beim Eintritt der Elektronen in die Probe werden diese abgebremst. Bei dieser negativen Beschleunigung der Ladung wird elektromagnetische Strahlung freigesetzt. Diese sogenannte Bremsstrahlung ist kontinuierlich bezüglich ihrer Energie bzw. Wellenlänge und liegt im Röntgenbereich ($\lambda = 5 \text{ pm} - 10 \text{ nm}$). Werden Rumpfelektronen der Probenatome durch Primärelektronen herausgeschlagen, können die entstandenen Lücken der inneren Elektronenschalen durch Elektronenübergänge aus höheren Schalen gefüllt werden. Die Energiedifferenz eines Übergangs wird in Form von Röntgenquanten freigesetzt. Da die elektronischen Übergänge elementspezifisch und von der Ordnungszahl des ionisierten Atoms und den entsprechenden Schalen abhängig sind, werden bei diesem Vorgang charakteristische Wellenlängen emittiert. Jedes Element liefert daher spezifische Röntgenlinien. Die so detektierte „charakteristische Röntgenstrahlung“ kann zur Materialanalyse genutzt werden (EDX=Energie-dispersive Röntgenanalyse)²¹⁸⁻²²⁰.

3.3.5 AFM (Atomic Force Microscopy = Rasterkraftmikroskopie)

Die Bestimmung der Gelelastizitäten erfolgte durch ein "Nano Wizard I" AFM der Firma JPK Instruments AG. Das Gerät ist auf einem optischen Mikroskop befestigt (Zeiss Axiovert 200). Die Messung der Hydrogele erfolgte durch Eindrücken (*Indentationsmessungen*) mittels eines Silikonitrid Hebelarms (*Cantilever*) mit einer konischen Spitzenform (μ masch NSC 35 ALBS). Die Federkonstanten wurden durch Kalibrierung über das thermische Rauschen ermittelt und befanden sich im Bereich von 2,3 N/m und 8,2 N/m²²¹. Der Öffnungswinkel der Cantileverspitze wurde für jeden Cantilever durch Rasterkraftmikroskopie bestimmt, da dieser einen entscheidenden Parameter zur Messung des Youngschen Moduls durch die Hertz Methode²²² darstellt. Sämtliche Messungen mittels AFM und deren Auswertung wurden durch Dr. Ilia Louban durchgeführt.

3.3.6 Mikroskope und Software

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden mittels Axiovert 40 CFL durchgeführt, als Objektive dienten je ein 5x/0.12 Aplan, ein 10x/0.25 Ph 1 Aplan, ein 20x/0.30 Ph 1 LD Aplan und ein 40x/0.50 Ph 2 Aplan Objektiv. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer AxioCam MRm CCD-Kamera getätigt und mit der Software AxioVision 4.0 LE (Vers. 4.2.0.0) digital erfasst. Alle genannten Produkte sind von der Firma Carl Zeiss AG.

Fluoreszenzmikroskopische und Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen wurden am DeltaVision Mikroskop (Applied Precision, Issaquah, WA), ausgestattet mit folgenden Objektiven: 10x/0.3 Ph 1 EC Plan-Neofluar (ZEISS), 20x/0.50 Ph 1 UPlanFl (Olympus), 40x/0.50 Ph 2 Aplan, 60x/1.4 UPlanApo Öl-Immersion (Olympus), durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD Coolsnap Kamera (Photometrix, Kew, Australia) aufgenommen.

Mikroskop, Setup und Software zur Visualisierung der Plasmodium Sporozoiten

Die mikroskopische Darstellung der *Plasmodium* Sporozoiten wurde mit einem invertierten Axiovert 200M Zeiss Mikroskop durchgeführt, welches mit einem GFP Filtersatz (37 (450/510) Zeiss) und mit einem 10x Apoplan Objektiv (pixel factor = 0.627) sowie einem 40x/0.50 Ph 2 Aplan ausgestattet war. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer Zeiss AxioCam HRM bei 1 Hz aufgenommen. Als Software diente die Axiovision Version 4.6. Drogenabhängige Messungen wurden mit einer Belichtungszeit von 150 ms und einer Aufnahmesequenz von zwei Sekunden aufgenommen. Sämtliche Aufnahmen wurden zur Analyse in ImageJ überführt und mittels ImageJ plugin ToAST (*tool for automatic sporozoite tracking*) (entwickelt durch Misha Kydryashev und Stephan Hegge, Dr. F. Frischknecht Gruppe) in Bezug auf das Bewegungsverhalten (*attachment, waving, circling counter-clockwise und clockwise*) und die Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) ausgewertet.

3.3.6 Quarzkristall-Mikrowaage (QCM-D)

Die Bestimmung der Proteinabscheidung auf unterschiedlichen PEG-Derivaten wurde mit dem E4 Sensorsystem von Q-Sense (Schweden, Västra Frölunda) durchgeführt. Für die Messungen wurde das Programm QSoft401 (Version 1.4.2) und für Auswertung QTools (Version 2) verwendet.

Prinzip:

Die Funktionsweise des QCM-D basiert auf dem piezoelektrischen Effekt. In dielektrischen Kristallen mit permanenten Dipolen und symmetrischer Verteilung der Einzelladungen wird eine Spannung generiert, wenn die Ladungen durch mechanische Belastung verschoben werden. Dieses Verhalten kann ebenfalls in umgekehrter Form beobachtet werden. Durch Anlegen einer externen Spannung wird eine Deformation des Kristalls hervorgerufen. Die kristalline Form von Quarz

(SiO₂) weist diese piezoelektrischen Eigenschaften auf. Der in einem sogenannten AT-Schnitt aus dem natürlichen α -Quarzkristall herausgeschnittene Kristall weist eine Dickenschwingung auf. Die Spannung wird mit Hilfe von aufgedampften Goldelektroden angelegt. Eine Gleichspannung induziert hierbei im Kristall eine Scherbewegung. Im Falle einer Wechselspannung beginnt der Kristall zu schwingen. Entspricht die Anregung der Eigenfrequenz f_0 , so kommt es zur Resonanz (Abbildung 40 a, b, c). Nach Abschalten der Wechselspannung, folgt eine gedämpfte, mechanische Schwingung des Kristalls. Diese kann durch Messung des abnehmenden, elektrischen Feldes quantifiziert werden. Der Abfall der Energie der gedämpften Schwingung im Verhältnis zur Gesamtenergie wird als Dissipation (D) bezeichnet. Formel 10 beschreibt die resultierende Schwingung (Abbildung 40 d).

$$A(t)=A_0 \exp (-\pi f D t) \sin (2 \pi f t+\theta) \quad \text{Formel 10}$$

Wobei A_0 die Anfangsschwingung, f die Frequenz und θ den Phasenwinkel darstellen. Die Berücksichtigung der Dissipation, lässt Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften der adsorbierten Massen zu. So führen weiche und träge Massen zu einer größeren Dissipation als rigide Massen. Der Kristall kommt im Falle eines elastischen, weichen Adsorbats schneller zur Ruhe (Abbildung 40 e).

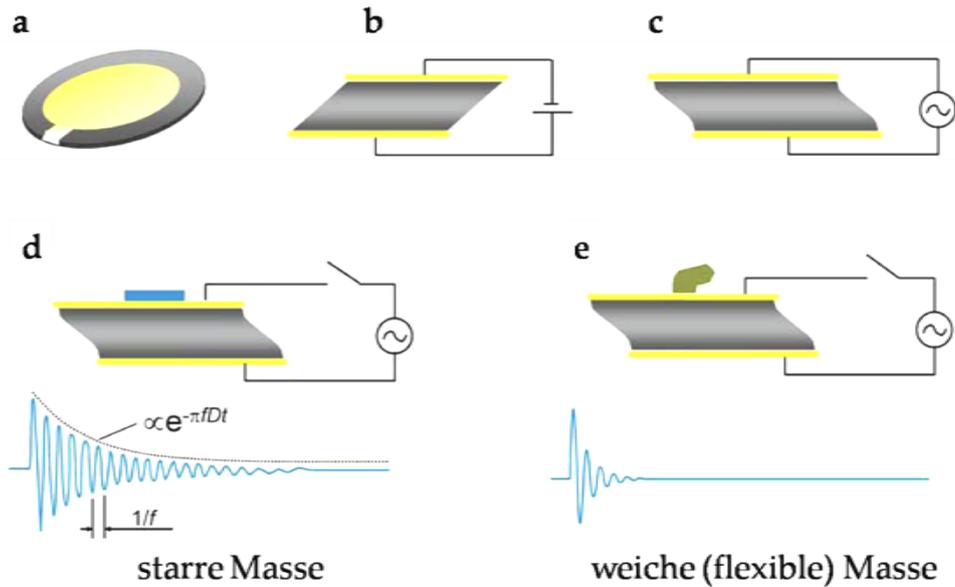


Abbildung 40: Prinzip der QCM-D Messung. a) Der Quarzkristall ist zwischen zwei Goldelektroden eingefasst. b) Gleichspannung bewirkt eine Scherbewegung des Kristalls. c) Anlegen einer Wechselspannung mit der Eigenfrequenz verursacht Resonanz. d) Nach Ausschalten der Wechselspannung nimmt die Amplitude der Kristallschwingung exponentiell ab, wenn die adsorbierte Masse rigide ist. e) Im Falle einer weichen, elastischen Masse wird nicht nur die Frequenz, sondern ebenfalls die Dissipation beeinflusst.

Das Auftragen einer starren Masse auf den Quarzkristall verursacht eine Verringerung der Schwingungsfrequenz, wodurch er als Massensensor fungieren kann. Neben der Grundschwingung können zur Anregung der Resonanzschwingung auch die ungeraden Obertonschwingungen ($n=1, 3, 5, \dots, 13$) verwendet werden. Der Zusammenhang zwischen Frequenzänderung und adsorbierter Masse wird durch die Sauerbrey-Gleichung (Formel 11) dargestellt²²³.

$$\Delta m = -\frac{v_q \rho_q}{2f_0^2} \cdot \frac{\Delta f}{n} = -C \frac{\Delta f}{n} \quad \text{Formel 11}$$

Aufgrund der, genau bestimmten Dicke des Quarzkristalls ist der Fehler der Eigenfrequenz f_0 (5 MHz) vernachlässigbar. Mit Δm = Massendifferenz, Δf_n = Frequenzunterschied und den für den Quarz spezifischen Größen, $\Delta \rho$ = Dichte des Quarzes ($2,65 \text{ g/cm}^3$), v_q = Schallgeschwindigkeit im Kristall (3340 m/s), lässt sich

die Massensensitivitätskonstante C zusammenfassen. Für diese ergibt sich in Flüssigkeit, für den hier verwendeten Sensor, ein Wert von $17,7 \text{ ng/cm}^2\text{Hz}$. Streng genommen ist die Sauerbrey-Gleichung nur unter folgenden Voraussetzungen der adsorbierten Massen gültig: sie müssen a) rigide sein, b) dürfen nicht verrutschen c) müssen gleichmäßig auf dem Kristall verteilt sein und d) müssen klein im Verhältnis zur Masse des Kristalls sein. Bei Messungen von weichen Massen treten daher Abweichungen auf. So werden in diesem Fall weitere Messmethoden, wie Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR)²²⁴, Reflektometrie²²⁵ und Ellipsometrie²²⁶ verwendet. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich diese nur zur Analyse von Trockenmassen eignen. Im Vergleich hierzu werden bei QCM-D Messungen immer die hydratisierten Massen gemessen. Im Falle der in dieser Arbeit durchgeführten Messung zur passivierenden Wirkung unterschiedlicher Polyethylenglykol-Derivate spielt dieser Faktor eine entscheidende Rolle. Da bei diesen Messungen nur die Frequenzänderung, also eine Massenzunahme und nicht die Dissipation berücksichtigt wurde, wird im Folgenden QCM anstelle von QCM-D geschrieben.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialwissenschaftlicher Teil

4.1.1 Reinigung und Aktivierung der Glassubstrate

Die Reinigung und Aktivierung der Glassubstrate erfolgte durch Caro'sche Säure. Hierfür wurden die Glassubstrate in einen Teflonhalter sortiert und in einem Duran®glasbehälter der stark oxidierenden Mischung aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30 %) und Schwefelsäure (H_2SO_4 , 95 %) in einem Verhältnis von 1:3 ausgesetzt.

Nach 90 Minuten wurde die Säure durch MilliQ®-Wasser ersetzt. Dieses wurde mehrmals ausgetauscht und die Glassubstrate somit sorgfältig von Caro'scher Säure befreit. Die Glassubstrate wurden direkt vor Verwendung im Stickstoffstrom getrocknet.

4.1.2 Präparation der HAuCl_4 -beladenen mizellaren Lösung

Polystyrol(x)-*block*-poly(2-vinylpyridin)(y), PS(x)-*b*-P2VP(y) wurde in, mit Caro'scher Säure gereinigte, Glasgefäße eingewogen und bei Raumtemperatur in einer entsprechenden Menge Toluol (analysenrein) bzw. p-Xylol (analysenrein) 24 h gerührt. Anschließend wurde der Lösung eine stöchiometrische Menge Tetrachlorgoldsäure HAuCl_4 zugegeben und bis zur vollständigen Lösung der Goldsäure gerührt (ca. 24 h). Die Menge der Einwaage von HAuCl_4 wurde in Abhängigkeit der Anzahl der P2VP-Einheiten und der Beladung L (Verhältnis AuCl_4^- zu P2VP-Einheiten) nach folgender Gleichung (Formel 12) berechnet. Für die meisten Lösungen wurde hierbei eine Beladung von 0,5 eingesetzt.

$$m(\text{HAuCl}_4) = \frac{m(\text{Polymer}) \cdot L \cdot M(\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}) \cdot \text{Anzahl}(\text{PVP}_{\text{Einheiten}})}{M(\text{Polymer})} \quad \text{Formel 12}$$

Das Molekulargewicht von HAuCl_4 ist abhängig vom Gehalt des Kristallwassers. Hier wurde Tetrachlorgoldsäuremonohydrat verwendet ($M_{\text{HAuCl}_4} = 339,79 \text{ g/mol}$).

In Tabelle 3 sind das Molekulargewicht des Polymers ($M_{\text{PS-}b\text{-PVP}}$) und die Anzahl der PVP-Einheiten der in dieser Arbeit verwendeten Diblockcopolymeren aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Diblockcopolymeren.

Polymer	PS Einheiten	PVP Einheiten	M_w/M_n
PS(25000)- <i>b</i> -P2VP(15000)	240	143	1,04
PS(110000)- <i>b</i> -P2VP(52000)	1056	495	1,15
PS(216000)- <i>b</i> -P2VP(60000)	2074	571	1,05
PS(557000)- <i>b</i> -P4VP(75000)	5348	713	1,07

4.1.3 Strukturelle Dekoration der Glassubstrate mit Gold-Nanopartikeln

Die Strukturbenetzung der Glassubstrate wurde mittels einer speziell angefertigten *Tauchvorrichtung* durchgeführt. Hierbei wurden die Gläser bei einer konstanten Geschwindigkeit aus einer entsprechenden Lösung (Kap. 4.1.2) gezogen. Die Kalibrierung der Geschwindigkeiten ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die senkrecht hängend getrockneten Glassubstrate wurden anschließend einem Mikrowellen-induzierten Plasma ausgesetzt. Nach 15-minütigem Sauerstoffplasma (0,4 mbar O_2 , 150 W), folgten direkt 30 Minuten im Wasserstoffplasma (0,4 mbar, H_2 , 150 W).

Tabelle 4: Kalibrierung der Geschwindigkeiten der *Tauchvorrichtung*.

Volt U [V]	3	6	8	10	12	16	18	20
Geschwindigkeit v [mm/min]	4,5	11,1	15,5	19,9	24,3	33,1	37,5	41,9

Die Strukturierung der gekrümmten Glasfaseroberflächen erforderte weit höhere Geschwindigkeiten (Tabelle 5). Zu diesem Zweck wurde eine spezielle *Hochgeschwindigkeits-Tauchvorrichtung* angefertigt (Abbildung 41).

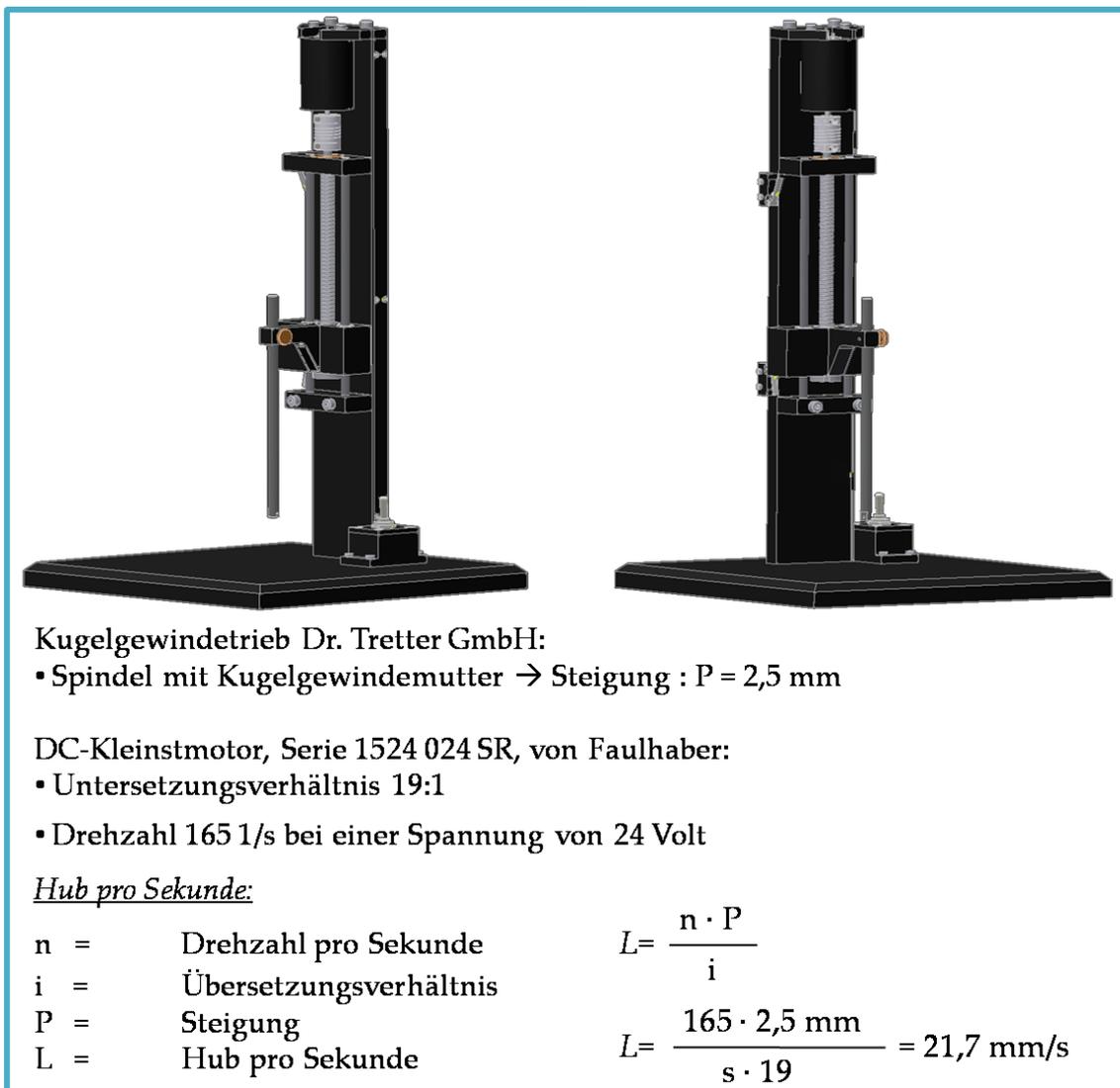


Abbildung 41: Technische Daten der *Hochgeschwindigkeits-Tauchvorrichtung*.

Tabelle 5: Kalibrierung der Geschwindigkeiten der *Hochgeschwindigkeits-Tauchvorrichtung*.

Volt U [V]	8	12	16	20	24	28	32	35	38	40
Geschwindigkeit v [mm/s]	5,9	9,6	13,0	16,2	20,3	23,4	27,4	29,3	31,9	34,2

4.1.4 Ätzen der Glasfasern

Nach Entfernen der Acrylathülle durch Abziehen und anschließende Reinigung mittels Aceton (p.A.) wurden die Glasfasern (Durchmesser 120 μm) senkrecht in eine 48 %ige HF-Säure gehängt und bis auf Durchmesser zwischen 10 μm und 70 μm geätzt. Anschließend wurden sie zunächst gründlich mit destilliertem Wasser gespült und nachfolgend nochmals für 15 Minuten in ein 1:1 Extran/Wasserbad getaucht. Nach erneutem Waschen mit Milli-Q-Wasser wurden die nun hydrophilen Fasern direkt vor der weiteren Verwendung getrocknet.

4.1.5 Synthese von Polyethylenglykolen mit terminalen Acrylatfunktionen (PEG-DA)

Die verwendeten Polyethylenglykol-Diacrylate (PEG-DA) wurden nach einem leicht modifizierten, literaturbekannten Verfahren synthetisiert ²²⁷. PEG-10000 (50 g, 5 mmol) wurde durch Kodestillation mit Toluol getrocknet (3×250 ml). Der Rückstand wurde unter Schutzgasatmosphäre in Dichlormethan (125 ml) und Toluol (75 ml) gelöst. Triethylamin (1,4 ml, 10 mmol) und Acrylsäurechlorid (1,25 ml, 15 mmol) wurden nacheinander zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde durch Al_2O_3 filtriert, anschließend wurden 12,5 g K_2CO_3 der Lösung zugesetzt und 1,5 h gerührt. Nach erneutem Filtrieren wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel (Dichlormethan)

befreit. Der Rückstand wurde unter Rühren mit 400 ml Diethylether aufgenommen. Nach weiteren 2 h Rühren wurde der weiße Rückstand durch wiederholtes filtrieren gewonnen und mit Diethylether (2×100 ml) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurde das reine Produkt in einer 80-90 %igen Ausbeute (40-45 g) erhalten. PEG-10000-DA, PEG-20000-DA und PEG-35000-DA wurden in gleicher Weise synthetisiert.

PEG-10000-DA: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ): 6.40 (dm, $J = 17.3$ Hz, 2H), 6.13 (ddd, $J = 1.1, 10.3, 17.3$ Hz, 2H), 5.81 (dm, $J = 10.3$ Hz, 2H), 4.29 (m, 4H), 3.85 (m, 6H); 3.73-3.51 (m, 1066H), 3.38 (m, 6H).

PEG-20000-DA: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ): 6.40 (dm, $J = 17.3$ Hz, 2H), 6.13 (ddd, $J = 1.1, 10.3, 17.3$ Hz, 2H), 5.81 (dm, $J = 10.3$ Hz, 2H), 4.29 (m, 4H), 3.85 (m, 12H); 3.73-3.51 (m, 2240H), 3.38 (m, 14H).

PEG-35000-DA: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ): 6.38 (dd, $J = 1.4, 17.3$ Hz, 2H), 6.10 (dd, $J = 10.3, 17.3$ Hz, 2H), 5.78 (dd, $J = 1.4, 10.3$ Hz, 2H), 4.26 (m, 4H), 3.82 (m, 32H); 3.64-3.53 (m, 5000H), 3.35 (m, 34H).

4.1.6 PEG-DA-Polymerisation

PEG-700-DA wurde in einer Konzentration von 500 $\mu\text{l/ml}$ in entgastem Wasser gelöst. Für PEG-10000-DA, PEG-20000-DA und PEG-35000-DA wurde eine Konzentration von 300 mg/ml verwendet. Die wässrige PEG-Lösung wurde 30 min gerührt. Anschließend wurde eine wässrige (entgast), gesättigte Lösung des Initiators 4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl-(2-propyl)keton zugegeben. Für PEG-700-DA wurde die Initiatorlösung in einer Menge von 0,25 $\mu\text{l/mg}_{\text{PEG-DA}}$ eingesetzt, im Falle von PEG-10000-DA, PEG-20000-DA und PEG-35000-DA wurde eine Konzentration der Lösung von 0,15 $\mu\text{l/mg}_{\text{PEG-DA}}$ verwendet. Durch kurzes Anlegen von Vakuum wurden Luftblasen aus der Lösung entfernt. Die gesamte Durchführung wurde unter

Schutzgas vollzogen. Die folgende UV-Bestrahlung (Wellenlänge 365 nm) erfolgte je nach Experiment für eine Dauer von 20, 35, 45 und 60 Minuten.

4.1.7 Übertragung der Gold-Nanopartikel

Zur Übertragung der Goldpartikel wurden die nanostrukturierten Glassubstrate eine Stunde in einer 2 mmolaren ethanolischen Lösung von *N, N'*-Bis(acryloyl)cysteamin funktionalisiert. Anschließend wurde ungebundener Linker durch spülen mit Methanol (analysenrein) entfernt und die Substrate vorsichtig im Stickstoffstrom getrocknet.

4.1.8 Funktionalisierung der Glassubstrate mittels Siloxan-Linker

Zur Funktionalisierung der Glassubstrate mittels Allyltrimethoxysilan wurden diese zunächst gemäß Kap. 4.1.1 in Caro'scher Säure gereinigt und aktiviert. Anschließend wurden sie nochmals 10 Minuten einem Wasserstoff-Plasma ausgesetzt. Die frisch aktivierten und noch warmen Glassubstrate wurden direkt dem Silanderivat ausgesetzt.

- *In Lösung:* Allyltrimethoxysilan wurde in einer Konzentration von 10 µl/ml in Toluol gelöst und direkt auf die vorbereiteten Glassubstrate gegeben. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Glassubstrate mit Methanol (analysenrein) nachgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.
- *In Gasphase:* Die gereinigten und aktivierten Glassubstrate wurden zusammen mit reinem Allyltrimethoxysilan (200 µl-Tropfen) in einem Exsikkator evakuiert. Nach zweistündiger Funktionalisierung der hydroxylierten Glassubstrate in der Silanatmosphäre, wurden die Substrate dem Exsikkator

entnommen. Nach Verflüchtigung des ungebundenen Silans wurden die Substrate zur weiteren Reaktion, der Copolymerisation zur Anbindung der Hydrogele, verwendet.

4.1.9 Präparation der nanostrukturierten Hydrogelsubstrate zur experimentellen Anwendung

Um besonders gute Bedingungen für die Handhabung, insbesondere für mikroskopische Anwendungen zu gewährleisten, wurden die nanostrukturierten Hydrogele in einer Weise hergestellt, in der sie als dünne Schichten auf einem Glassubstrat gebunden vorlagen.

Die Präparation der mit Goldpartikeln dekorierten und auf Glas gebundenen Hydrogelschichten erfolgte durch Einbettung der nach Kap. 4.1.5 vorbereiteten PEG-Initiatorlösung (Abbildung 42 c). Hierzu wurde ein *N, N'*-Bis(acryloyl)cysteamin-Linker kovalent an die Goldpartikel der nanostrukturierten Glassubstrate (Kap. 4.1.3) gebunden (Kap. 4.1.6/Abbildung 42 a). Zeitgleich wurden aktivierte Glassubstrate mit Allyltrimethoxysilan (Kap. 4.1.7/Abbildung 42 b) funktionalisiert. Durch UV initiierte (Wellenlänge 365 nm) Kreuzpolymerisation der ungesättigten, aktiven Endgruppen der jeweiligen Linker mit der PEG-Initiatorlösung wurde eine Anbindung des Hydrogelfilms an das Glassubstrat sowie eine Übertragung der Goldpartikel erzielt (Abbildung 42 c). Hierbei konnte durch Verwendung von Abstandshaltern die Schichtdicke des Gels vorgegeben werden.

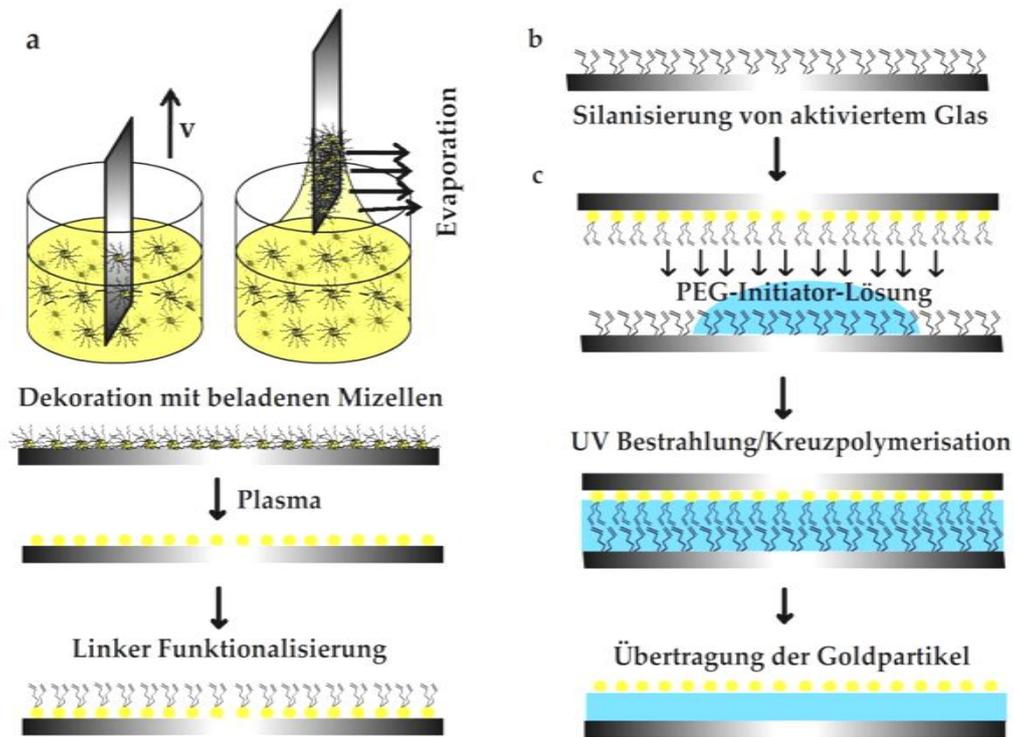


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Präparation nanostrukturierter, gebundener Hydrogele. (a) Die Anordnung der Goldpartikel in einer quasi hexagonalen Struktur auf einer anorganischen Oberfläche basiert auf der Selbstorientierung von Diblockcopolymer-Mizellen. Die nach einer Plasmabehandlung erhaltenen Goldstrukturen werden mittels Linkersystem (N, N' -Bis(acryloyl)cysteamin) während des Polymerisationsprozesses übertragen. (b) Die PEG-DA-Initiatorlösung wird auf ein, mit Allyltrimethoxysilan, behandeltes Glassubstrat pipettiert und durch das, mit funktionalisierten Goldpartikeln, dekorierte Gegenglas bedeckt. Nach UV-induzierter Copolymerisation der jeweiligen Linkersysteme mit dem Polymer, werden die Substrate in Wasser gelagert. Hierbei kommt es durch einen leichten Schwellprozess der Gele zu einem vorsichtigen Ablösen des Gegengläschens. Dies resultiert in der Übertragung der Goldstruktur auf das dünn-schichtig gebundene Hydrogel (c).

Abbildung 43 stellt den Mechanismus der Verzweigungsreaktionen während der radikalischen Kreuzpolymerisation und somit die kovalente Kopplung der Goldpartikel sowie die Anbindung der Hydrogele an Glassubstrate dar.

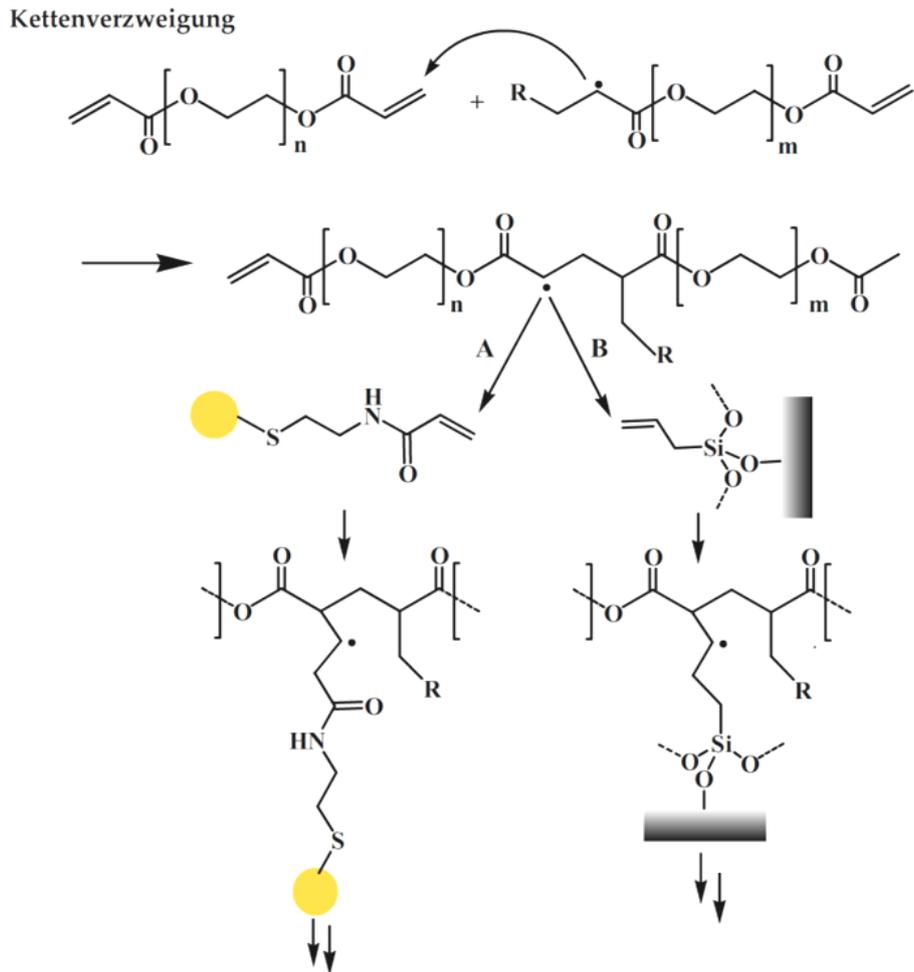


Abbildung 43: Mechanismus der Verzweigungsreaktionen. A) Übertragung der Goldpartikel. B) Anbindung der Gele an Glassubstrate.

4.1.10 Präparation der nanostrukturierten Hydrogelröhren

Die nach Kap. 4.1.4 zu gewünschten Durchmessern geätzte Glasfasern wurde mittels Tauchbeschichtungsverfahren (Kap. 4.1.3) mit, je nach Durchmesser, spezifischen Geschwindigkeiten von 16,2-34,2 mm/s (Tabelle 5) und anschließender Plasmabehandlung nanostrukturiert (Abbildung 44 a). Die Übertragung der hochgeordneten Goldstruktur auf das Hydrogelpolymer erfolgte äquivalent zu flachen Glassubstraten mittels Linkersystem (Kap. 4.1.7, Abbildung 44 b). Um eine gleichmäßige Form des Hydrogels mit zur Mikroskopie kompatibler Dicke zu gewährleisten, wurden die Fasern in spezielle Gussformen eingespannt. Dabei

wurde zusätzlich der vordere Teil einer Pipettenspitze kontinuierlich mit der Faser verbunden und mit in das Hydrogel einpolymerisiert (Abbildung 44 b, rechts). Die resultierende Trichterform am Ansatz der Mikroröhre ermöglichte eine einfache und sichere Befüllung der Röhre mit experimentsspezifischen Medien.

Die Polymerisation des Hydrogels erfolgte nach Kap.4.1.6 bei einer UV-Bestrahlungszeit von 45 Minuten. Da die hier produzierten Hydrogele nicht als dünne Schichten an Glas gebunden sind und somit das Schwellverhalten nur ein geringe Rolle spielt, können zur Herstellung der Hydrogelröhren auch unverdünnte PEG-Lösungen verwendet werden. In diesem Fall wurden 2 ml PEG-700-DA mit 130 µl Initiatorlösung vermengt und in die Gussform gefüllt.

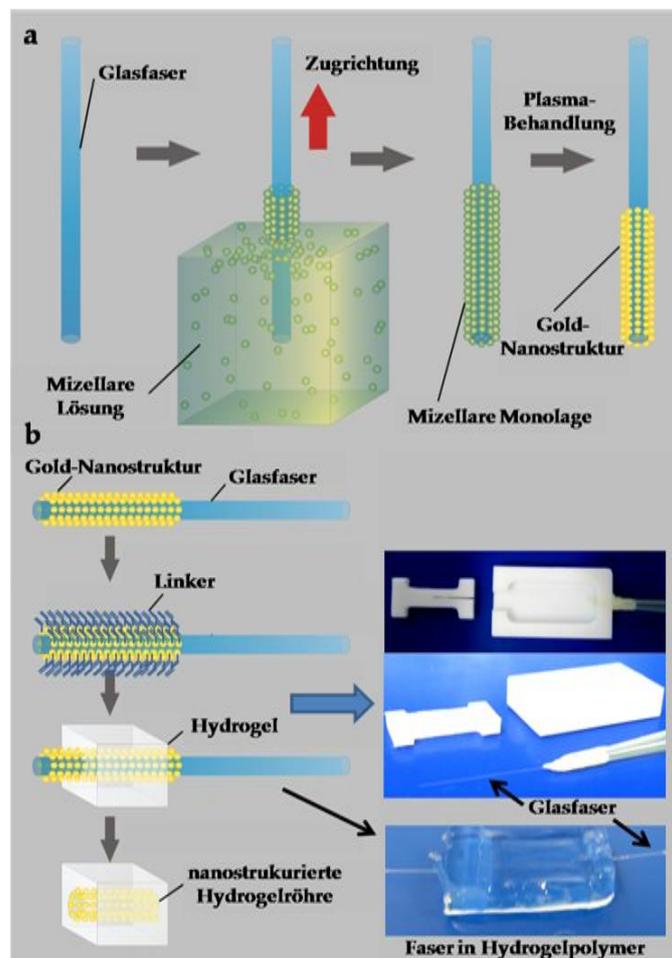


Abbildung 44: Praktische Vorgehensweise zur Herstellung nanostrukturierter Hydrogelröhren²²⁸.

4.1.11 Mikrostrukturierte Proteinimmobilisierung auf Goldstrukturen mittels *Microcontact printing*

Zur kovalenten Formierung von Proteinen auf Gold-nanostrukturierten Substraten in Mikrostrukturen wurden die nanostrukturierten Hydrogele zunächst 3 h bei Raumtemperatur in einer 2 mmolaren Lösung von HS-(CH₂)₁₁-EG₃-Biotin in Ethanol/Wasser (1:1) inkubiert. Im Folgenden wurden die Substrate gründlich mit einer Ethanol/Wasser-Mischung (1:1) gewaschen, um nicht kovalent gebundenes Biotin zu entfernen.

Die für den Stempelprozess verwendeten Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) Stempel^{iv} wurden zuvor in einem Ethanol-Ultraschallbad gereinigt und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Im Folgenden wurden die vorbereiteten Stempel 20 Minuten bei Raumtemperatur einer Lösung von Streptavidin-FITC in PBS (10 µg/ml) ausgesetzt. Nach Trocknen im Stickstoffstrom wurden sie gleichmäßig eine Minute lang auf die nanostrukturierten Hydrogeloberflächen gepresst. Abschließend wurden die Stempel vorsichtig gelöst und die Hydrogele in PBS gewaschen und gelagert, wodurch ungebundenes Streptavidin beseitigt wurde.

4.1.12 Biofunktionalisierung der Goldstruktur mittels c(RGDfK)-thiol

Für die Biofunktionalisierung der Gold-Nanostrukturen zur Förderung der Zelladhäsion wurde das zyklische Peptid c(RGDfK)-thiol verwendet. Hierzu wurden die nanostrukturierten PEG-DA-Substrate 6 h im Kühlschrank in einer wässrigen Lösung von c(RGDfK)-thiol (25 µM) inkubiert. Um ungebundenes c(RGDfK)-thiol zu entfernen, wurden die Substrate anschließend dreimal je 30 Minuten in Milli-Q-Wasser gewaschen und anschließend über Nacht in sterilem PBS gelagert. Die Biofunktionalisierung durch c(RGEfK)-thiol wurde in gleicher Weise durchgeführt.

^{iv} Die PDMS-Stempel wurden freundlicher Weise von Jasmin Zahn zur Verfügung gestellt.

4.1.13 Partielle (halbseitige) Funktionalisierung der Hydrogele mittels Carboxyfunktionen

Plasma-aktivierte, hydrophile Deckgläschen wurden mit einer mehrfach ungesättigten Fettsäure beschichtet. Hierfür wurde analog zur Nanostrukturierung ein sogenanntes *dip coating* Verfahren angewandt. Dabei wurden die aktivierten Gläschen in eine Linolensäure-Toluol-Lösung (2 µl/ml) getaucht und mit einer konstanten Geschwindigkeit senkrecht herausgezogen. Anschließend wurden sie 5 Minuten bei 60 °C erwärmt. Der nachfolgende Übertragungsprozess (Kap. 4.1.14) auf die Hydrogele erfolgte durch Kreuzpolymerisation der ungesättigten Enden während der in Kap. 4.1.5 beschriebenen Polymerisation der Hydrogele.

4.1.14 Präparation der Carboxy-funktionalisierten Hydrogel-substrate zur experimentellen Anwendung

Auch hier wurden die funktionalisierten Hydrogele zur optimalen Handhabung während der experimentellen Anwendungen als dünne, auf Glassubstrate gebundene Schichten dargestellt. Hierbei wurde wie in Kap. 4.1.8 verfahren. Die Gegengläschen stellten in diesem Fall, anstelle der funktionalisierten Nanostrukturen, Carbonsäure-dekorierte Glassubstrate dar (Abbildung 45a). Die Kreuzvernetzung der ungesättigten Silane (Abbildung 45b) und der mehrfach ungesättigten Reste der Linolensäure erfolgte durch Einbettung der PEG-DA-Initiatorlösung (Kap. 4.1.5) zwischen diesen Substraten unter UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 365 nm (Abbildung 45c).

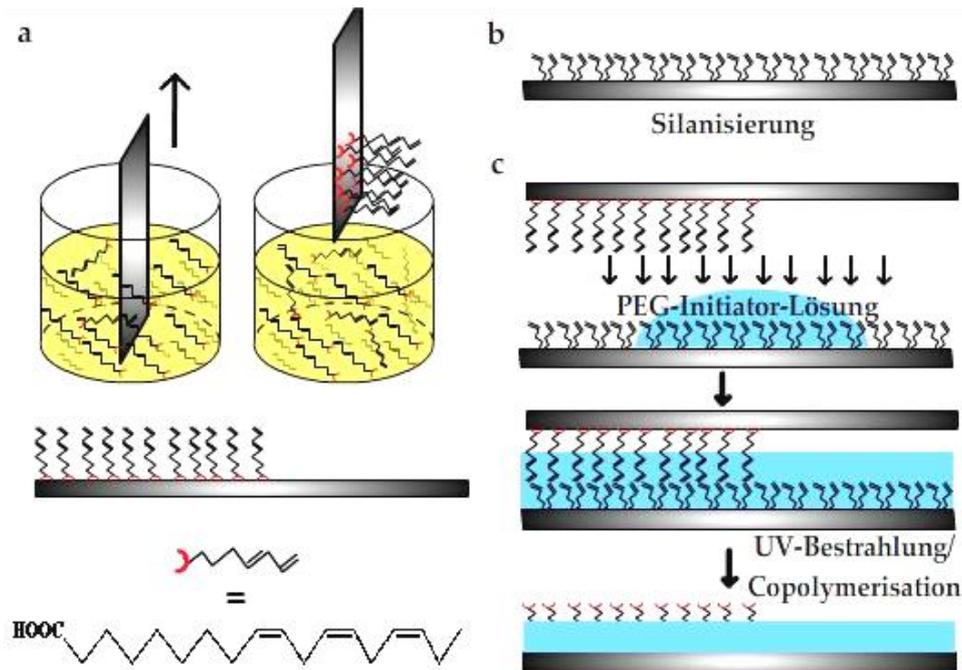


Abbildung 45: Schema der Darstellung partiell funktionalisierter Hydrogele. (a) Die Ausrichtung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren basiert auf der Orientierung der amphiphilen Säure mit der hydrophilen Seite auf aktivierten, hydrophilen Glassubstraten. Diese partielle Beschichtung wird während eines Polymerisationsprozesses auf das PEG-DA-Hydrogel übertragen. (b) Die PEG-DA-Initiatorlösung wird auf ein mit Allyltrimethoxysilan funktionalisiertes Glassubstrat pipettiert und anschließend mit dem säuredekorierten Glas bedeckt. (c) Nach UV-induzierter Kreuzpolymerisation werden die Substrate in Wasser oder PBS gelagert, wodurch ein sanftes Ablösen des Gegengläschens induziert wird.

4.1.15 Mikrostrukturierte Anordnung von Carboxyfunktionen auf Hydrogelsubstraten

Die Darstellung der Mikrostrukturen erfolgte durch einen Übertragungsprozess orientierter Carbonsäuren auf das Hydrogel. Diesem Schritt ging das Stempeln der Linolensäure auf ein hydrophiles Glas voraus. Hierfür wurden 2 µl/ml Linolensäure in Ethanol gelöst. Anschließend wurden Polydimethylsiloxan (PDMS) - Stempel 20 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Nach Trocknen im Stickstoffstrom wurden die Stempel auf aktivierte, hydrophile Glassubstrate gepresst. Die folgende Kreuzpolymerisation der freien, ungesättigten Enden der Säure und der PEG-700-

DA-Initiatorlösung resultierte in einer definierten Mikrostruktur aus Carboxygruppen auf Hydrogelsubstraten (Kap. 4.1.16).

4.1.16 Präparation der mikrostrukturierten Anordnung von Carboxyfunktionen auf Hydrogelsubstraten zur experimentellen Anwendung

Die Darstellung der mikrostrukturiert funktionalisierten Hydrogele wurde auch hier, zur optimalen Handhabung, in dünnen Schichten auf Glas gebunden generiert. Hierbei wurde nach dem in Kap. 4.1.8 beschriebenen *Sandwich*-Schema verfahren. Die zuvor auf aktivierte Glassubstrate gestempelte, mehrfach ungesättigte Fettsäure (Abbildung 46a, Kap. 4.1.15) wurde während des Polymerisationsprozesses zusammen mit den aktiven Endgruppen des Siloxan-funktionalisierten Basissubstrats (Abbildung 46b) und der PEG-700-DA-Initiatorlösung vernetzt (Abbildung 46c).

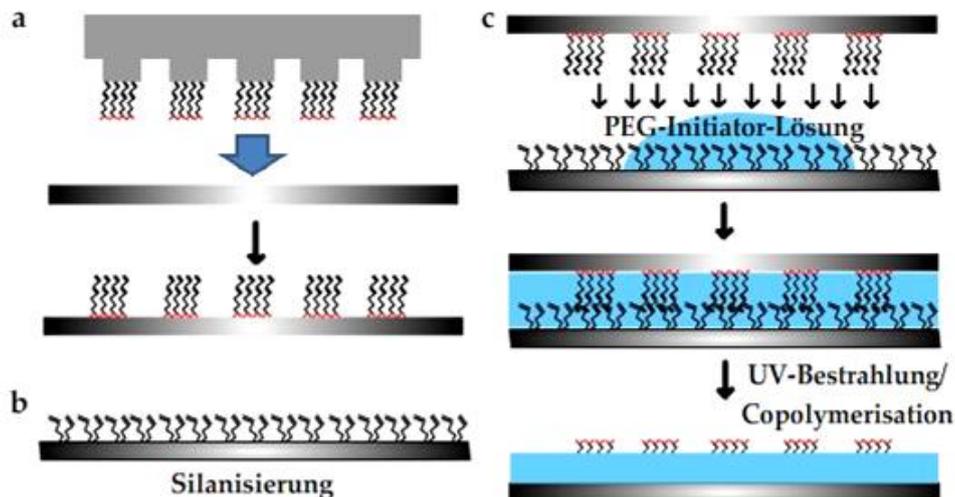


Abbildung 46: Schematisierter Prozess der Herstellung mikrostrukturiert funktionalisierter Hydrogele. (a) Mittels *Microcontact printing* wird die mehrfach ungesättigte, amphiphile Fettsäure in einer wohlgeordneten Mikrostruktur auf hydrophilen Glassubstraten generiert. (b) PEG-DA/Initiatorlösung wird auf, mit Allyltrimethoxysilan funktionalisierte, Basisgläser pipettiert und (c) mit dem Linolensäure-strukturierten Glas bedeckt. Nach UV-Bestrahlung werden die kreuzvernetzen

Gele in PBS oder Wasser gelagert. Nach sanftem Ablösen der Gegengläser erhält man dünne, gebundene Gele mit oberflächigen Carboxyfunktionen in mikrostrukturierter Ordnung.

4.1.17 Anbindung des fluoreszenten Fibronektin-FITC an Carboxygruppen

Die Carboxygruppen wurden mittels 200 mmol 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, gelöst in PBS, aktiviert. Nach 20 Minuten wurden die Substrate zweimal schnell in PBS gewaschen und direkt mit Fibronektin-FITC (5 µg/ml) inkubiert (Abbildung 47). Die Inkubation des Fibronektins wurde 2 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht im Kühlschrank durchgeführt. Abschließend wurden die Substrate gründlich mit PBS gewaschen um ungebundenes Fibronektin zu entfernen.

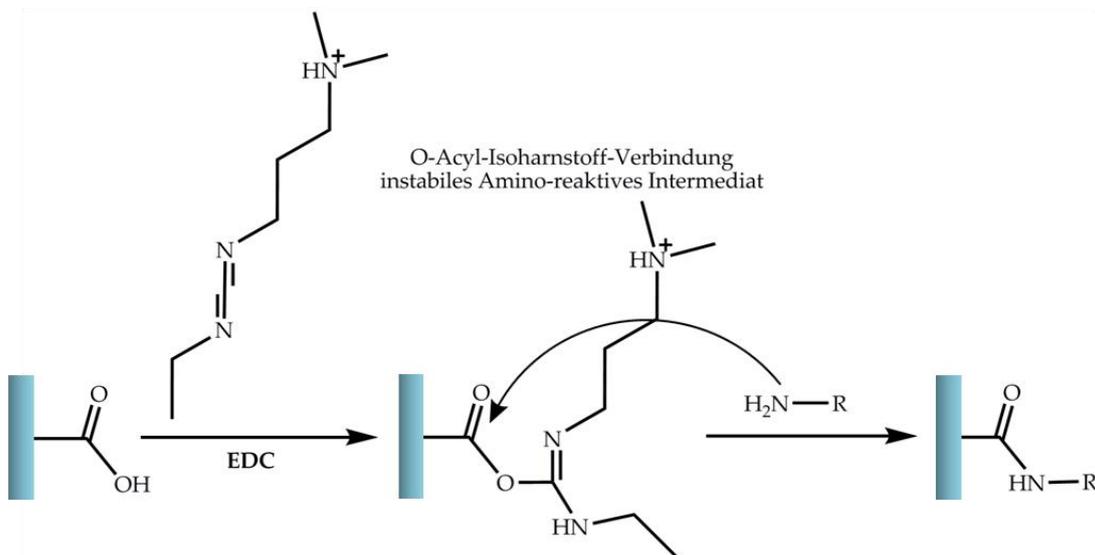


Abbildung 47: Kopplung von Proteinen. Links: Aktivierung der Carboxy-Gruppen des funktionalisierten Hydrogels mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Mitte: Amino-reaktives Intermediat. Rechts: Stabile Amid-Bindung zwischen Hydrogel und Protein.

4.1.18 Kopplung der Peptide an Carboxy-funktionalisierte Hydrogele

Die Carboxygruppen wurden mittels 200 mmol 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid, gelöst in PBS, 20 Minuten aktiviert. Anschließend wurden die Substrate zweimal schnell in PBS gewaschen und direkt mit dem entsprechenden Peptid (Tabelle 6) umgesetzt (Abbildung 47). Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Substrate mit PBS gewaschen.

Tabelle 6: Verwendete Peptide.

Peptid	Fibronectin	Laminin	Poly-L-Lysin	Heparin
Konzentration	10 µg/ml PBS	50 µg/ml PBS	25 µg/ml PBS	250 µg/ml PBS

Kollagen Typ I (Ratte): (für insgesamt 50 ml) 5,5 ml einer 1%igen Essigsäure wurden mit 44 ml Wasser und 545 µl Kollagen Typ I vermischt. Die Inkubation der Lösung auf den carboxylierten Oberflächen erfolgte bei 4°C über Nacht.

4.6 Zellkultur

4.6.1 Kultivieren von Zellen und Vorgehensweise in der Zellkultur

Um Kontamination durch Mikroorganismen zu vermeiden, wurden sämtliche Vorgänge der Kultivierung von Zellen unter einer sterilen Bank mit laminarer Luftströmung (Heraeus Kendro, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Des Weiteren wurde auf steriles Arbeiten geachtet und steriles Material sowie sterile Lösungen verwendet.

Ansetzen des Zellmediums:

10 Vol-% FBS (fetal bovine serum) (5ml) wurden mit 1 Vol-% L-Glutamin (0,5 ml) vermengt und mit DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) auf insgesamt 50 ml aufgefüllt.

Kultivieren und Splitten der Zellen bei konfluentem Bewuchs des Zellkulturflaschenbodens:

Die Zellen wurden mit spezifischem Medium in Zellkulturflaschen, oder in sogenannten well plates (Lochplatten, Greiner bio-one, Belgien) bei 37 °C und 5% CO₂ - (Messer Griesheim) Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Nach Erreichen eines konfluenten Flaschenbodenbewuchses wurde das Medium entfernt, mit sterilem PBS (37°C) nachgespült und anschließend, zum Ablösen der Zellen, eine warme (37 °C), 2,5 %ige Trypsin/EDTA-Lösung (1-2 ml) auf die Zellen gegeben. Nach 3-5 Minuten wurden 5 ml Medium zugegeben und 3 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellett in 7,5 ml Medium (37 °C) resuspendiert. Schließlich wurde ein Teil der Zellsuspension in eine frische Kulturflasche überführt, mit Medium aufgefüllt und bei 37 °C / 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Der verbleibende Teil der Zellsuspension wurde für Zellexperimente auf den jeweiligen Substraten verwendet.

4.6.2 Setzen der Zellen auf Substratoberflächen

Die frisch unter UV-Bestrahlung polymerisierten und somit sterilen Hydrogelsubstrate wurden nochmals mit sterilem PBS gewaschen und nach Kap. 4.1.12 mittels c(RGDfK)-thiol funktionalisiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurde dieses entfernt und die feuchten Hydrogele wurden direkt mit einer geringen Menge (~0,5 ml) der Zellsuspension (Kap. 4.6.1) bedeckt. Nach 1-2 Minuten, in denen sich die Zellen absetzen konnten, wurde mit Medium aufgefüllt. Die

Substrate wurden zur weiteren Inkubation mindestens 4 Stunden im Brutschrank (37 °C / 5% CO₂) gelagert.

4.6.2 Immunozytochemisches Anfärben von Zellen

Die zellbewachsenen Substrate wurden dreimal mit PBS (RT) gewaschen und anschließend zur Fixierung der Zellen 20 min in 3,7 % Paraformaldehyd inkubiert. Zur Permeabilisierung wurde, nach wiederholtem Waschen mit PBS, eine 0,1 %ige Lösung Triton X-100/PBS für 10 min auf das Substrat gegeben. Um unspezifisches Anbinden der Antikörper zu vermeiden, wurden die Proben 10 min in einer 1 %igen BSA/PBS-Lösung gelagert. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei Raumtemperatur mit einem *mouse anti-human vinculin* Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Zugabe des Alexa 488-Sekundärantikörpers (1:50 Lösung in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Markierung des filamentösen Aktins wurde 1 mg/ml Phalloidin-TRITC in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und zusammen mit dem Sekundärantikörper in einer 1:200 Verdünnung in PBS inkubiert. Das Anfärben des Zellkerns erfolgte im gleichen Schritt mittels 10 µg/ml 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer 1:100 Verdünnung in PBS.

4.7 Sporozoiten-Kultur

4.7.1 Präparation der Sporozoiten

Plasmodium berghei (Stamm NK65) Sporozoiten, welche unter der Kontrolle eines stadiumsspezifischen Promotors zytoplasmatisches GFP (green fluorescent protein) exprimieren, wurden in der *Anopheles stephensi* Mücke produziert ²²⁹ (Abbildung 31 b-d). Enthalten die Speicheldrüsen der Moskitos *Plasmodium* Sporozoiten, sind diese 17 Tage nach der Blutmahlzeit von infizierten Mäusen

fluoreszent. Für sämtliche Experimente wurden Speicheldrüsen-Sporozoit, 17-23 Tage nach Infektion der Mücke, verwendet. Je nach Experiment wurden unterschiedliche Mengen von Speicheldrüsen in RPMI (Zellkultur Medium, Formulierung entwickelt am Roswell Park Memorial Institute) sezerniert und experimentsspezifisch mit 3 %, 1 % oder 0 % BSA versetzt. Die Speicheldrüsen wurden mit einem Plastik-Stößel in einem Eppendorf-Gefäß zerdrückt, wodurch die Sporozoit freigesetzt wurden. Um die Sporozoit vom Überstand und Speicheldrüsenresten zu separieren wurden die Parasiten anschließend bei 500 U/min und 4 °C fünf Minuten zentrifugiert.

4.7.2 Setzen der Sporozoit auf Substratoberflächen

Ein Tropfen Medium mit Sporozoit (5 µl) wurde auf ein Deckglas (24 mm x 60 mm) pipettiert. Die Sporozoit enthaltende Lösung wurde mit der Hydrogelseite des Glassubstrats bedeckt und an den Rändern mit einer erwärmten Mischung aus Parafin, Vaseline und Lanolin (1:1:1) versiegelt. Anschließend wurde das gesamte Substrat umgedreht, um ein Absetzen und Adhärenz der Sporozoit auf dem funktionalisierten Hydrogelfilm zu ermöglichen. Nach 5-10 minütiger Wartezeit wurden die Sporozoit fluoreszenzmikroskopisch betrachtet und gefilmt. Aufgrund des mikroskopischen Aufbaus wurden die sich zyklisch bewegenden Sporozoit gegen den Uhrzeigersinn laufend visualisiert.

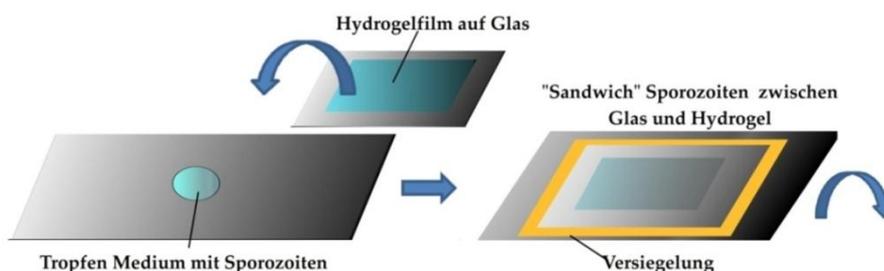


Abbildung 48: Präparation der Proben für die Mikroskopie.

4.7.3 Setzen der Sporozoiten in Mikroröhren

Es wurden je 10 µl des Mediums mit Sporozoiten in die Hydrogelröhren pipettiert. Durch Kapillarwirkung wurde diese Lösung gleichmäßig in der Röhre verteilt. Die beiden Öffnungen der Röhre wurden mit einer warmen Mischung aus Parafin, Vaseline und Lanolin (1:1:1) verschlossen. Das Hydrogel wurde auf einem dünnen Deckglas platziert und während der mikroskopischen Beobachtung stetig feucht gehalten.

4.7.4 Kritische-Punkt-Trocknung von *Plasmodium* Sporozoiten für REM-Aufnahmen

Zunächst wurden die *Plasmodium* Sporozoiten nach ca. 15-minütiger Inkubation auf nanostrukturierten Glassubstraten fixiert. Hierzu wurde 3,7 %ige PFA-Lösung (Paraformaldehyd in PBS) bis zur vollen Bedeckung auf die Substrate pipettiert. Nach dreimaligem waschen in PBS wurden die Präparate in eine ethanolische Reihe überführt. Beginnend mit 50 %, folgten 60 %, 70 %, 80 %, 90 % und schließlich dreimal 100 % Ethanolgehalt. Die jeweiligen Inkubationsschritte dauerten 15 Minuten. Anschließend wurden die Substrate in die Kammer des Kritisch-Punkt-Trockners überführt, welche mit 100 % Ethanol befüllt wurde. Nach Erreichen einer Temperatur von 10 °C und einem Druck von 50 bar wurde das Lösungsmittel aus der Kammer abgezogen und diese mit CO₂ gefüllt. Dieser letzte Vorgang wurde zwölfmal wiederholt. Schließlich wurde die Kammer mit flüssigem CO₂ befüllt und auf eine Temperatur über der kritischen Temperatur erwärmt. Bei dieser Temperatur von 40 °C und einem Druck von 90 bar wurde das überkritische CO₂ um Phasentrennung zu vermeiden, über ein fein einstellbares Dosierventil vorsichtig aus der Kammer abgeleitet.

4.8 Proteinabweisende Eigenschaften kovalent gebundener PEG-Beschichtungen

4.8.1 Anbindung der PEG-Derivate an Sensor-Quarzkristalle²³⁰

Sämtliche PEG-Derivate wurden durch Dr. Jacques Blümmel, wie in der Literatur 230 beschrieben, synthetisiert.

Zur Reinigung und Aktivierung der Sensor-Quarzkristalle wurden diese eine Stunde einem reaktiven Sauerstoffplasma ausgesetzt.

Kopplung der PEG-Derivate

Die Anbindung der in Abbildung 49 aufgeführten PEG-Derivate erfolgte in einem Zweistufenmechanismus. Zur Silanisierung der hydrophilen Quarzkristalle wurden diese 1h bei Raumtemperatur mit 3-Glycidyloxypropyltriethoxysilan (GOPTES) bei einer Oberflächenkonzentration von 5 µl/cm² inkubiert. Die Funktionalisierung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre. Hierbei wurden jeweils zwei Kristalle „Oberfläche zu Oberfläche“ („face to face“) angeordnet. Schließlich wurden die Substrate mit Cyclohexan (p.A.) gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet und direkt zur Kopplung der PEG-Derivate weiterverwendet.

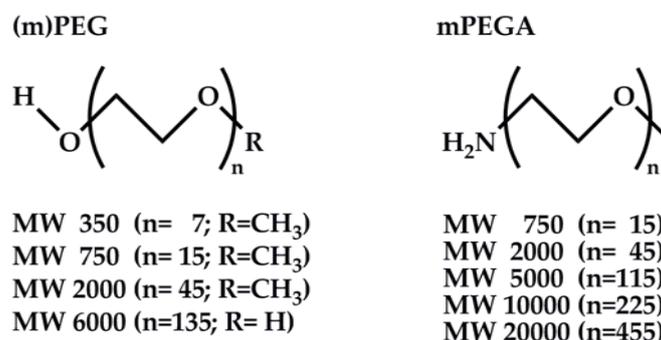


Abbildung 49: PEG-Derivate zur Anbindung an, mit 3-Glycidyloxypropyltriethoxysilan behandelte, Quarzsensorkristalle.

Die silanisierten Substrate wurden im Weiteren 48 h bei 75-95 °C unter Schutzgasatmosphäre einer Schmelze des jeweiligen (m)PEGs (Abbildung 49) ausgesetzt. Im Falle der Aminopolyethylenglykolmonomethylether (mPEGA) wurde lediglich ein dünner Film geschmolzenen mPEGAs zwischen zwei („face to face“) GOPTES-funktionalisierten Substraten generiert. Anschließend wurden die Proben sorgfältig mit Millipore®-Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

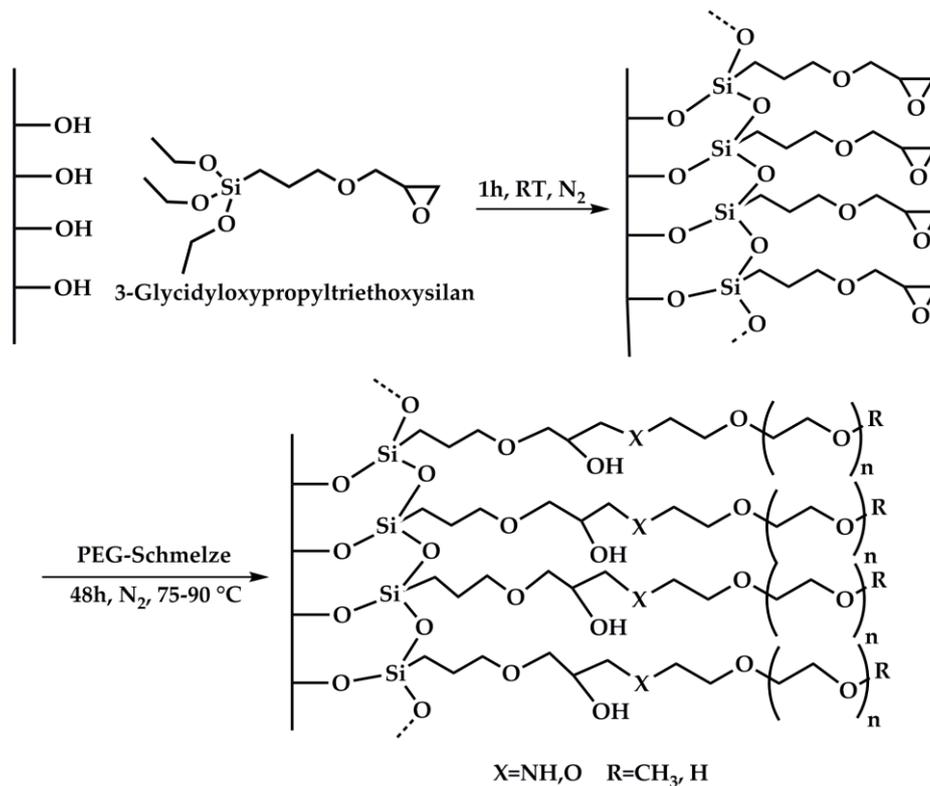


Abbildung 50: Schematische Darstellung des Kopplungsmechanismus der PEG-Anbindung über 3-Glycidyloxypropyltriethoxysilan.

Anbindung der mPEG-Triethoxysilane:

Die plasmabehandelten, hydrophilen Quarzkristalle wurden unter Schutzgasatmosphäre in einer 0,25 mmolaren trockenen Lösung des jeweiligen mPEG-Triethoxysilans (Abbildung 51) in Toluol (p.A.) und 2,5 μM Triethylamin auf 80 °C erhitzt. Nach 16-20 h wurden sie mit Ethylacetat (p.A.) gespült, 2 Minuten einem Ultraschallbad ausgesetzt und anschließend nochmals mit Methanol (p.A.)

gespült. Nach direktem Trocknen im Stickstoffstrom wurden die PEG-beschichteten Substrate für QCM-Messungen verwendet.

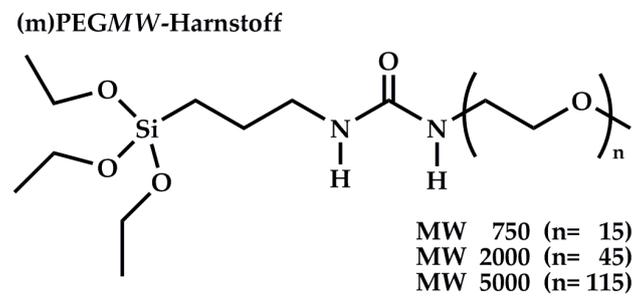
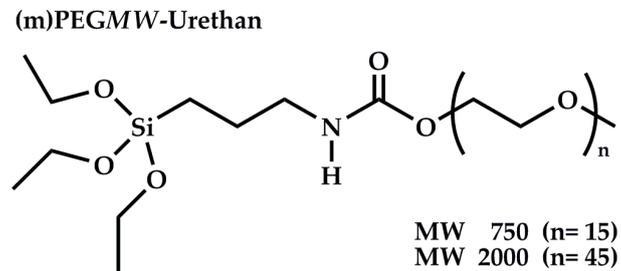


Abbildung 51: PEG-Derivate mit Silan-Ankergruppe.

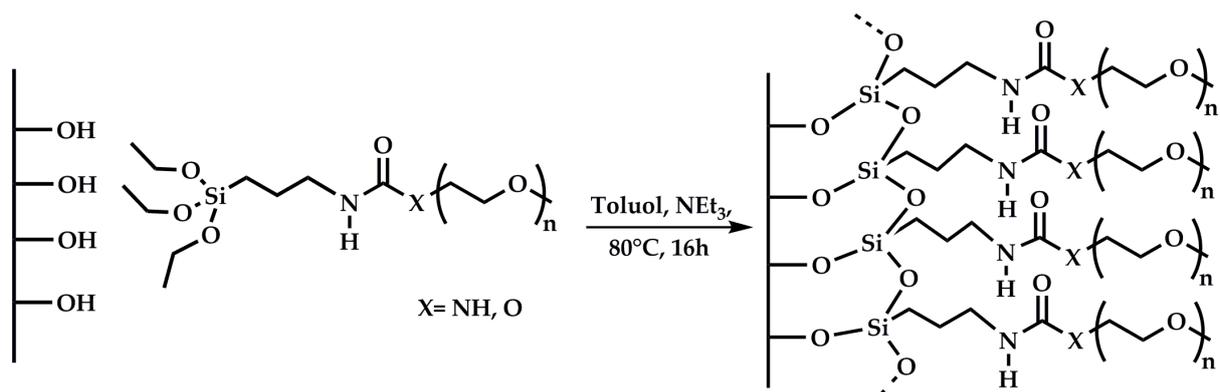


Abbildung 52: Schematische Darstellung der Anbindung der PEG-Derivate mit Silananker an hydrophile Quarzkristalloberflächen.

4.8.2 Quarzkristall-Mikrowaagen (QCM) Messungen²³⁰

Die Quarz-Sensorkristalle wurden im Sauerstoffplasma gereinigt und aktiviert, mit den entsprechenden PEG-Derivaten beschichtet (Kap. 4.8.1) und anschließend direkt in die Analysenkammer des QCM-Systems eingebaut. Sämtliche Messungen wurden bei einer konstanten Flussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer Temperatur von 23 °C durchgeführt. Nach Eichen des Systems mit PBS (phosphate buffered saline) wurden die beschichteten Sensorkristalle Lösungen mit ansteigender Konzentration von BSA (bovine serum albumin) (0,01%, 0,1%, 1% und 5%) und FCS (fetal calf serum) (0,01%, 0,1%, 1% und 10%) ausgesetzt. Nach jedem Konzentrationsintervall von 15-minütiger Inkubation bei konstanter Flussrate folgte ein fünfminütiger Waschvorgang mit PBS um zwischen Viskositäts- und Adsorptionsbedingten Frequenzänderungen unterscheiden zu können. Die in Tabelle 7 aufgeführten Δf Werte wurden zum Zeitpunkt der höchsten Proteinkonzentration gemessen. Sämtliche Werte wurden einem höheren Oberton ($n=11$) entnommen und unter Verwendung der Sauerbrey Gleichung²³¹ bezüglich des Grundtons normiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

Teil I Charakterisierung proteinabweisender Eigenschaften kovalent gebundener PEG-Beschichtungen

5.1 Charakterisierung der proteinabweisenden Eigenschaften unterschiedlicher PEG-Derivate mittels QCM²³⁰

Um die Qualität der nach Kap. 4.8.1. hergestellten PEG-Beschichtungen in Bezug auf ihre passivierende Wirkung gegen unspezifische Adsorption von Proteinen zu überprüfen, wurden SiO₂-Sensorkristalle mit unterschiedlichen PEG-Derivaten beschichtet und steigenden Konzentrationen von BSA und FCS ausgesetzt. Dabei wurde die Frequenzänderung mittels QCM bestimmt. Mit Hilfe des QCM lassen sich durch zeitaufgelöste Messungen Frequenzänderungen (Δf) aufzeichnen²³², welche mit den adsorbierten Massen (Δm) korrelieren und sich unter Verwendung der *Sauerbrey* Gleichung bestimmen lassen²³¹ (siehe Kap. 3.3.6). Für die hier genutzten Sensorkristalle entspricht demnach eine Frequenzänderung $\Delta f = 1$ Hz einer Änderung der Masse Δm von 17,7 ng/cm². Messungen von BSA in Konzentrationen von bis zu 50 mg/ml (5 %ig) und FCS bis zu 10 %ig zeigten im Vergleich zum reinen SiO₂ für sämtliche mit PEG-beschichteten Oberflächen selbst bei sehr hohen Konzentrationen eine stark herabgesetzte Adsorption der Proteine (Tabelle 7, Abbildung 53). Die besten Resultate wurden durch PEG-Amine erzeugt, welche an GOPTES-beschichtete Oberflächen gekoppelt wurden (Abbildung 50) und durch mPEG-Harnstoff-Derivate, welche direkt an die SiO₂ Oberflächen gebunden wurden (Abbildung 51, Abbildung 52)²³⁰. Im Vergleich zu den mPEG-Harnstoff-Beschichtungen zeigten die mPEG-Urethan-Beschichtungen (Abbildung 51) vermutlich aufgrund einer erhöhten Fragmentierung, welche durch XPS-Messungen

aufgezeigt wurde (diese Daten wurden durch Dr. Jacques Blümmel generiert und sind in der Literatur 230 gezeigt), eine verminderte Proteinresistenz.

Als am besten geeignete und zuverlässige, proteinabweisende Beschichtung unter den Ein-Schritt-Methoden (Abbildung 52), erwies sich die Beschichtung mit mPEG2000-Harnstoff.

Tabelle 7: Proteinabweisende Eigenschaften unterschiedlicher PEG-Beschichtungen.

Beschichtung	5% BSA, Δf [Hz]	10% FCS, Δf [Hz]
reines SiO ₂	41 (n = 1)	64 (n = 1)
mPEG750	5,3 ± 5,6 (n = 5)	11,3 ± 12,4
mPEG2000	0,5 ± 0,9 (n = 3)	13,0 ± 16,8 (n = 3)
PEG6000	0,7 ± 0,8 (n = 3)	8,0 ± 7,6 (n = 3)
mPEGA750	0 (n = 3)	3,2 ± 5,5 (n = 3)
mPEGA2000	0 (n = 4)	0 (n = 4)
mPEGA5000	0 (n = 4)	0 (n = 4)
mPEGA10000	0 (n = 4)	3,0 ± 4,2 (n = 2)
mPEGA20000	0 (n = 4)	0 (n = 4)
mPEG750 - Urethan	1,0 ± 1,2 (n = 3)	6,0 ± 0,7 (n = 2)
mPEG2000 - Urethan	1,6 ± 2,0 (n = 4)	6,6 ± 5,7 (n = 4)
mPEG750 - Harnstoff	0,3 ± 0,0 (n = 6)	4,9 ± 7,2 (n = 6)
mPEG2000 - Harnstoff	0 (n = 4)	0 (n = 4)
mPEG5000 - Harnstoff	0 (n = 4)	2,1 ± 1,4 (n = 4)

Abbildung 53 zeigt den Verlauf der Messungen. Die typischen Sensorreaktionen wurden vollständig durch die starke Änderung der Viskosität des Mediums im Falle höherer Proteinkonzentrationen verursacht und nicht durch Adsorption. Dies wird deutlich durch die Rückkehr der Frequenzänderung zu Null nach Austausch des proteinhaltigen Mediums durch PBS gezeigt. Geringe Ablagerungen wurden somit

gänzlich wieder gewaschen. Messungen von weiteren Proteinen auf mPEG2000-Harnstoff Beschichtungen, wie Fibrinogen (10 µg/ml) und Fibronectin (100 µg/ml) zeigten ebenfalls keine Adsorption. Des Weiteren zeigte diese mPEG2000-Harnstoff Beschichtung eine überaus gute Proteinresistenz gegen BSA (1 %) und FCS (10 %) bei Langzeitmessungen. Hierbei wurden die beschichteten Sensorkristalle über 36 h einem konstanten Fluss von 20 µl/min der Proteinlösungen ausgesetzt (Abbildung 54).

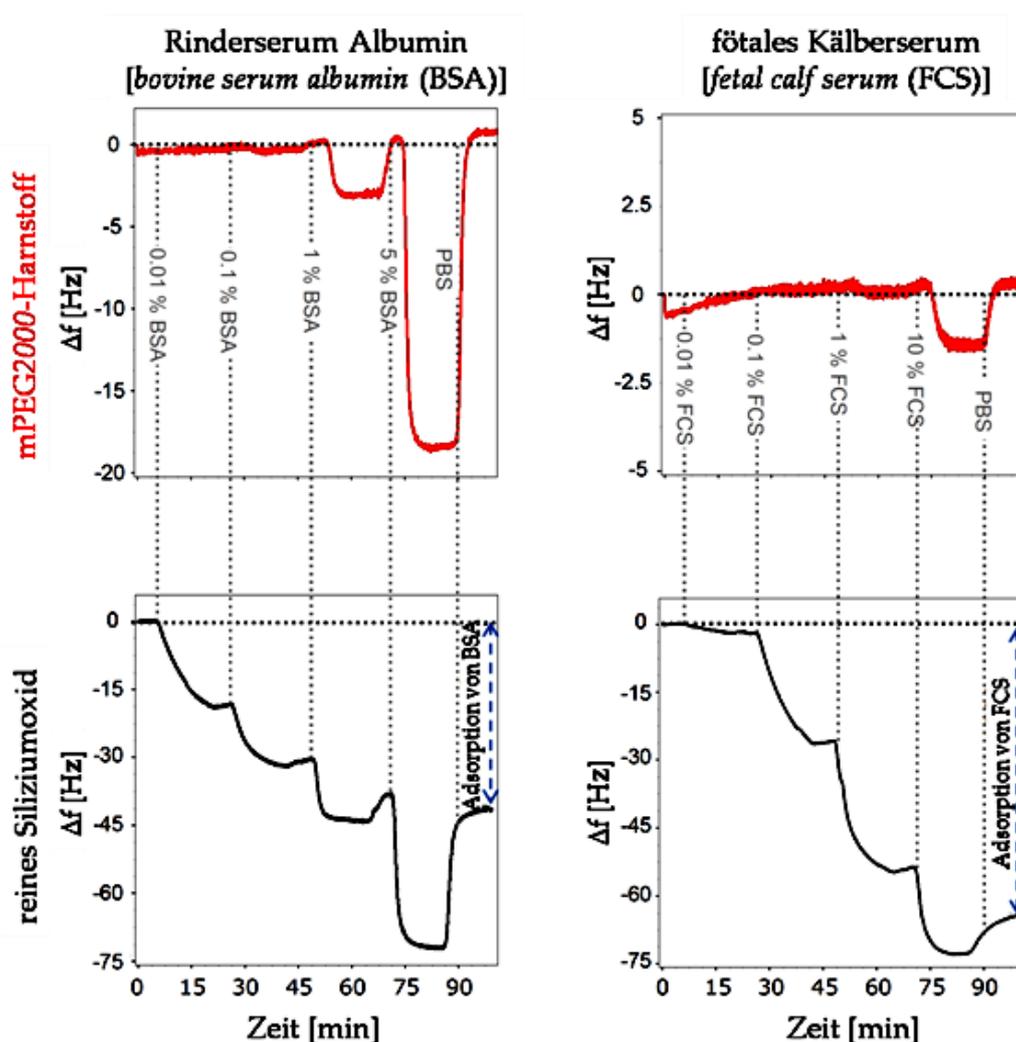


Abbildung 53: QCM-Messungen der Adsorption von Proteinen auf reinem SiO₂ und auf mPEG2000-Harnstoff-Substraten. BSA (links) und FCS (rechts) zeigten auf reinem SiO₂ starke Frequenzänderungen aufgrund von Proteinadsorption. Auf mPEG2000-Harnstoff beschichteten Sensorkristallen dagegen können weder BSA noch FCS adsorbieren.

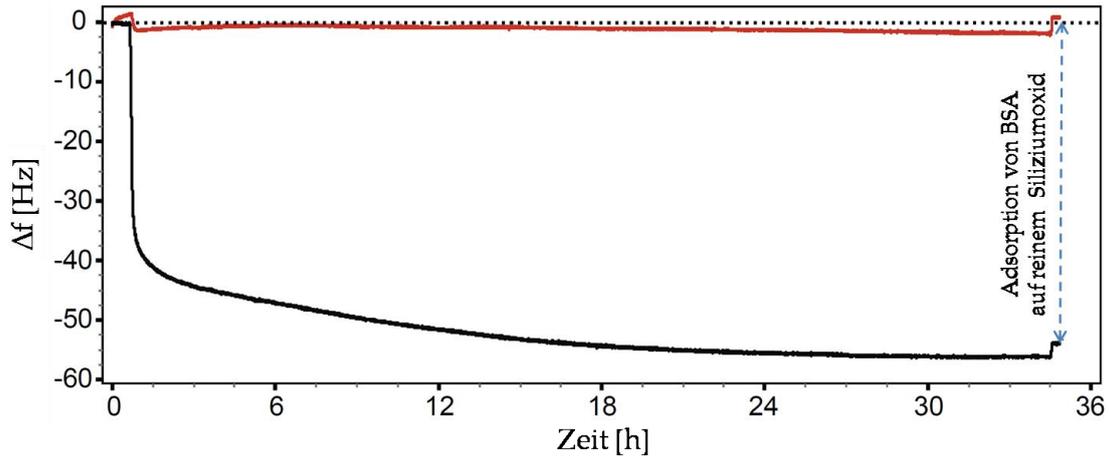


Abbildung 54: Langzeitmessung der passivierenden Eigenschaften von mPEG2000-Harnstoff beschichteten Substraten gegen BSA (1 %) bei konstantem Fluss. Eine Frequenzänderung aufgrund von BSA-Adsorption auf reinem SiO_2 ist deutlich zu erkennen (schwarze Linie). Mit mPEG2000-Harnstoff beschichtete Sensorkristalle zeigten keine Frequenzänderung aufgrund von Proteinadsorption (rote Linie).

Aufgrund der guten Handhabung und der erfolgreichen proteinabweisenden Wirkung der mPEG2000-Harnstoff Beschichtung wurde diese in dieser Arbeit zur Passivierung der Glasoberflächen der nanostrukturierten Substrate verwendet, welche zur Betrachtung der *Plasmodium* Sporozoiten auf Goldpartikeln im Rasterelektronenmikroskop dienten (Abbildung 83).

Teil II Entwicklung multivariabler Hydrogeloberflächen

5.2 Chip mit Stempelstruktur

5.2.1 Charakterisierung der Gold-nanostrukturierten Oberflächen

Die erfolgreiche Generierung der quasi-hexagonal geordneten Gold-Nanostrukturen auf Silizium, oder Glasoberflächen wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie überprüft. Abbildung 55 zeigt einige Beispiele der unterschiedlichen Partikelabstände, welche in dieser Arbeit hauptsächlich zur Untersuchung des Adhäsions- und Bewegungsmechanismus von Malariaparasiten verwendet wurden (Teil III).

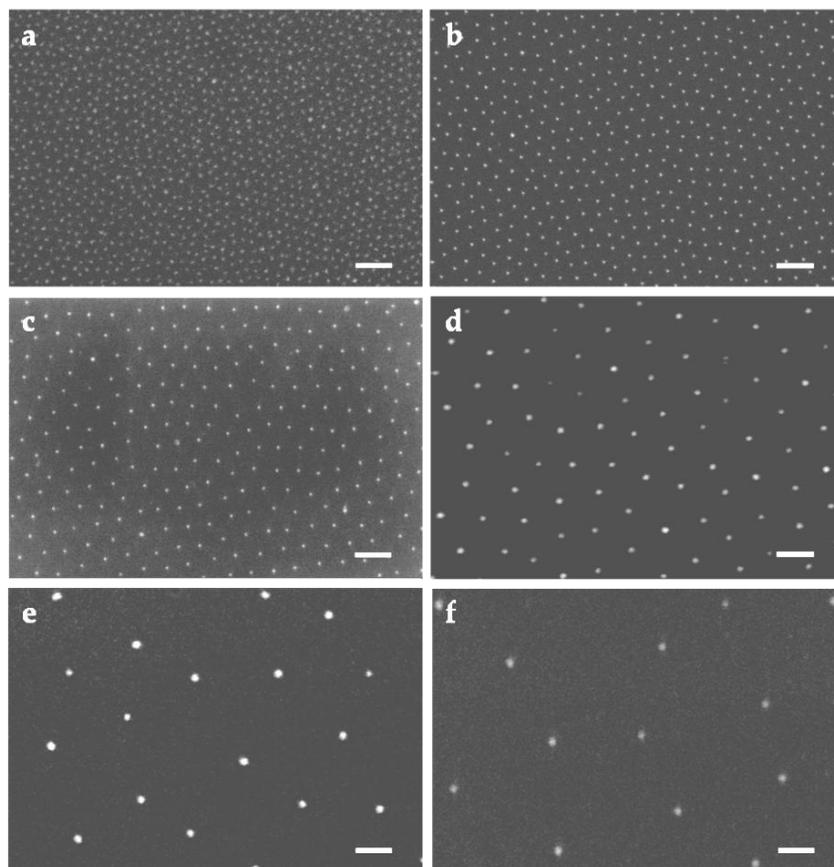


Abbildung 55: Quasi hexagonal geordnete Gold-Nanopartikel mit unterschiedlichen Partikelabständen. Die Abstände variieren von 40 nm bis 270 nm [a) 40 nm, b) 55 nm, c) 70 nm, d) 100 nm, e) 240 nm, f) 270 nm]. Die entsprechenden Charakteristika der Mizellösungen und der resultierenden Nanostruktur sind in Tabelle 8 aufgeführt. Der Skalierungsbalken entspricht 100 nm.

Die Parameter zur Herstellung der gewünschten Abstände wurden entsprechend ermittelt und vor Experimenten mittels Rasterelektronenmikroskopie überprüft.

In Tabelle 8 sind die verwendeten Parameter zur Herstellung dieser Strukturen beschrieben. Wie in Kap. 2.2.7 erläutert, werden die Abstände der Partikel innerhalb der Struktur durch das Molekulargewicht der Diblockcopolymeren beeinflusst, welches die Größe der Mizellen vorgibt und somit mit steigendem Molekulargewicht größere Abstände hervorbringt. Diese sind ebenfalls durch die Konzentration des Polymers und die Geschwindigkeit, mit welcher die Substrate aus der mizellaren Lösung gezogen werden einstellbar. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ließ sich ein großer Bereich von Abständen zwischen 40 und 270 nm erzielen. Da diese Parameter unabhängig voneinander sind, können mit derselben Lösung unterschiedliche Abstände generiert werden. Beispielsweise wurden mit dem Polymer PS(216000)-*b*-P2VP(60000) durch Variation der Geschwindigkeit Partikelabstände von 120 nm und 100 nm erzeugt, während die Größe der Partikel selbst davon unbeeinflusst blieb. Dabei nahm der Abstand der Partikel mit zunehmender Geschwindigkeit ab. Auffallend war hierbei, dass der Ordnungsparameter für Zuggeschwindigkeiten zwischen 10 und 40 mm/min höher war, als bei niedrigeren bzw. höheren Geschwindigkeiten. Möglicherweise kommt es bei zu langsamen Geschwindigkeiten zu Filmrissen, während ein zu schneller Zug der Substrate die Bildung von Multilagen fördern kann. Dieser Effekt trifft auf sämtliche Polymere zu, variiert jedoch im Grad der Auswirkung bei Verwendung unterschiedlicher Polymere. Die höchsten Ordnungsparameter wurden mit Polymeren im mittleren Bereich des Molekulargewichts (beispielsweise PS(110000)-*b*-P2VP(52000), PS(216000)-*b*-P2VP(60000)) bei mittleren Geschwindigkeiten von ca. 11-37 mm/min erzielt.

Tabelle 8: Verwendete Parameter zur Herstellung der Nanostrukturen. K = Konzentration des Polymers, L = molares Verhältnis von HAuCl_4 und der P2VP-Einheiten (Beladung), v = Geschwindigkeit, mit welcher das Substrat aus der Lösung gezogen wurde, A = Abstand der Partikel zueinander, Ψ = Ordnungsparameter (Formel 8).

Polymer	K [mg/ml]	L	v [mm/min]	A [nm]	Ψ
PS(25000)- <i>b</i> -P2VP(15000)	8	0,5	4,5	40 ± 5	0,49
PS(110000)- <i>b</i> -P2VP(52000)	5	0,5	19,9	55 ± 7	0,64
PS(110000)- <i>b</i> -P2VP(52000)	5	0,5	11,1	70 ± 8	0,65
PS(216000)- <i>b</i> -P2VP(60000)	2	0,5	33,1	120 ± 15	0,73
PS(216000)- <i>b</i> -P2VP(60000)	2	0,5	37,5	100 ± 10	0,69
PS(557000)- <i>b</i> -P4VP(75000)	1	0,2	6,8	240 ± 21	0,52
PS(557000)- <i>b</i> -P4VP(75000)	1	0,2	2,5	270 ± 26	0,50

5.2.2 Charakterisierung und Anbindung der PEG-DA-Hydrogele

Das Quellverhalten der Hydrogele nimmt eine wichtige Rolle bei der Herstellung des in dieser Arbeit vorgestellten Systems ein. So führt beispielsweise eine starke Volumenvergrößerung aufgrund des Quellvorgangs zu einem Ablösen von kovalent an Glas oder Siliziumwafer gebundenen Gelen. Um dies zu vermeiden wurden zahlreiche Messreihen durchgeführt, in denen die Wasserkonzentration der PEG-Initiator-Lösungen noch vor der Durchführung der Kreuzpolymerisation variiert wurde. Im Falle einer Erhöhung der Wasserkonzentration der PEG-Initiator-Lösung vor der Polymerisation zeigte sich eine deutliche Abnahme der Quellrate bei Lagerung der polymerisierten Hydrogele in Wasser (Abbildung 56). Die idealen Konzentrationen zur Anbindung der unterschiedlichen PEG-Gele sind in Kap. 4.1.6 aufgeführt.

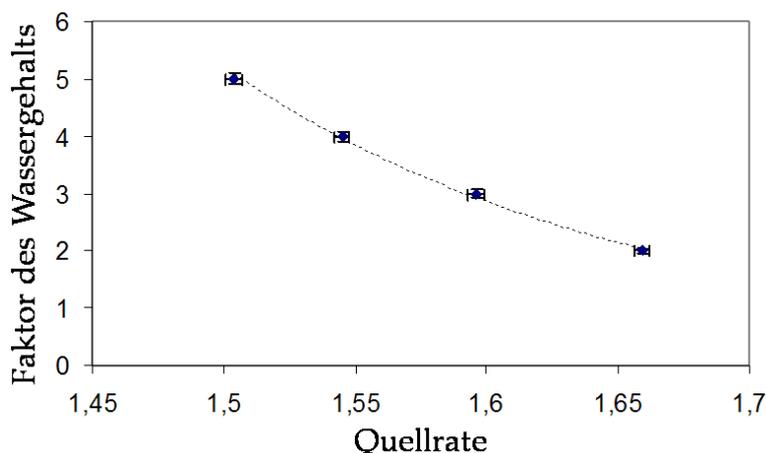


Abbildung 56: Quellrate am Beispiel des PEG-20000-DA. Der Faktor des Wassergehalts = 1 entspricht einer Konzentration von $250 \mu\text{l}_{[\text{Wasser}]} / 300 \text{mg}_{[\text{PEG}]}$. Die Quellrate entspricht der Volumenänderung. Die Variation des Wassergehalts der PEG-Initiator-Lösung vor der Kreuzpolymerisation wirkt sich stark auf das Quellverhalten der polymerisierten Gele aus.

Die Verringerung der Quellaktivität der fertig polymerisierten Hydrogele durch Aufnahme des Wassers vor der Polymerisation erwies sich als großer Vorteil. Zum Einen konnten die Hydrogele auf diese Weise über einen Silanlinker an feste Substrate gebunden werden, zum Anderen wirkte sich das Quellverhalten im Weiteren wesentlich geringer auf die Abstände der Partikel der übertragenen Gold-Nanostrukturen aus (siehe unten). Ein weiterer Vorteil der Konzentrationsvariation (PEG-Wasser) liegt in der Möglichkeit, durch gezielte Wahl der PEG-Konzentration in Kombination mit der Verwendung von PEGs unterschiedlicher molarer Massen, einen erstaunlich großen Bereich an Elastizitäten der kreuzvernetzten Hydrogele abzudecken. Wie in Abbildung 43 schematisch dargestellt wird, erfolgte die Anbindung der unterschiedlich elastischen Hydrogele an Glas- oder Siliziumsubstrate in kovalenter Form durch Kreuzvernetzung über ein Allylsilan-Linkersystem. Die Funktionalisierung der Plasma-aktivierten Glasoberflächen mittels Allylsilan wurde auf verschiedene Arten durchgeführt. Dabei erwiesen sich die in Kap. 4.1.8 beschriebenen Methoden, direkt aus der Gasphase oder in Toluol gelöst, als praktisch sehr gut durchführbar und höchst reproduzierbar. Die anschließende,

kovalente Anbindung der Gele durch die radikalische Kreuzpolymerisation führte zu sehr stabilen Substraten, welche optimale Bedingungen für mikroskopische Anwendungen und Handhabung während der experimentellen Schritte aufwiesen. Darüberhinaus überzeugten sie durch eine hohe Robustheit, lange Haltbarkeit und Stabilität.

Durch diese Methode der Anbindung lassen sich Substrate mit individuell variabler Größe, Schichtdicke und Anordnung herstellen. Auftragung der PEG-Initiatorlösung in einer sogenannten „Sandwich-Technik“ ermöglicht Schichtdicken ab ca. 10 μm Dicke. Diese Schichtdicke kann durch Verwendung von Abstandshaltern zwischen Trägerglas und Gegenglas beliebig variiert werden. Die Generierung von großflächigen, gebundenen Hydrogelsubstraten wurde gleichmäßig und luftblasenfrei durch Nutzung einer „Flusszellen-Technik“ realisiert. Abbildung 57 zeigt Beispiele von verschiedenen angebondenen Gelen.

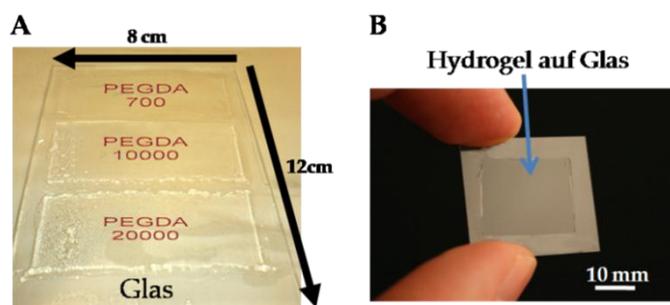


Abbildung 57: Darstellung angebondener Hydrogelfilme auf Glassubstraten. A) Verschiedene Hydrogele auf einem Substrat. Mittels verwendeter Flusszellentechnik ist es möglich auch große Bereiche mit Hydrogelfilmen luftblasenfrei zu bedecken. Dabei lässt sich die Dicke der Filmschicht über Abstandshalter beliebig variieren. B) zeigt die Auftragung einer sehr dünnen Hydrogelschicht (Dicke $\sim 10 \mu\text{m}$). In diesem Fall wurde eine sogenannte „Sandwich“-Technik verwendet.

Wie bereits beschrieben konnte die Festigkeit der polymerisierten Hydrogele spezifisch durch Variation des Molekulargewichts der PEG-DA-Makromere sowie durch Änderung der PEG-DA-Konzentration in der Polymerisationslösung für bestimmte Experimente gezielt angepasst werden. Die mechanische Eigenschaft der

Gele wurde mittels AFM-Messungen charakterisiert und durch den Youngschen Modul E_Y , welcher die Nachgiebigkeit eines Materials beschreibt, dargestellt. Die Messungen wurden nach dem in Kap. 2.4.3 erläuterten Prinzip (Formel 9) durchgeführt, in welchem die AFM- Spitze in das Hydrogel gedrückt und die entsprechende Auslenkung bestimmt wurde. Die Daten wurden unter Verwendung des Hertz Modells ermittelt¹²⁵. Je höher dabei der Wert des Youngschen Moduls E_Y , desto härter ist das Material. Es wurde gezeigt, dass die Elastizität der Hydrogele über einen Bereich von vier Größenordnungen (von 0,6 kPa bis 6 MPa) angepasst werden konnte (Abbildung 58). Diese Tatsache stellte einen interessanten Aspekt in Bezug auf die Untersuchung biologischer Systeme, wie in dieser Arbeit der Malariaparasiten, dar, da dieser Bereich der künstlich generierten Elastizitäten sämtliche Elastizitäten der unterschiedlichen Gewebeformen im menschlichen Körper imitiert¹³⁴. Ergänzend wurden für die glasgebundenen PEG-10000-DA, PEG-20000-DA und PEG-35000-DA Hydrogele Stichproben durchgeführt. Dabei wurden keine signifikanten Abweichungen der Elastizitäten im Vergleich zu den ungebundenen Hydrogelen beobachtet (Abbildung 58 B).

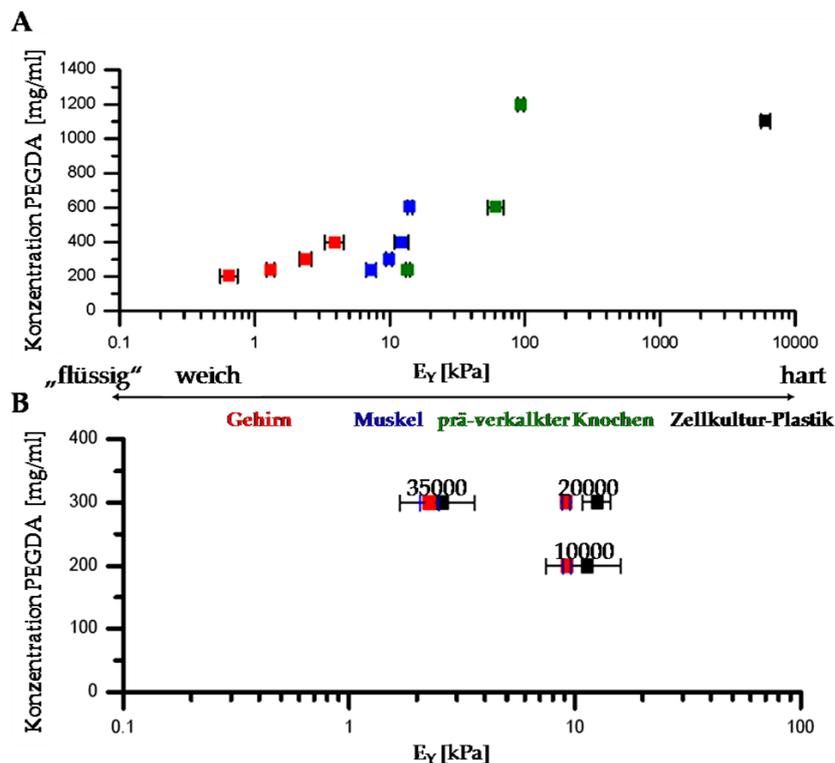


Abbildung 58: Youngsches Modul (E_γ) der unterschiedlichen PEG-Hydrogele. ■ PEG-700-DA, ■ PEG-10000-DA, ■ PEG-20000-DA und ■ PEG-35000-DA Hydrogele, welche mit unterschiedlichem Wassergehalt polymerisiert wurden. A) Nicht an Glas gebundene Hydrogele. B) Vergleich von an Glas gebundenen Hydrogelen ■ und nicht gebundenen ■^v.

Neben der Tatsache, dass die hier entwickelten Substrate im Vergleich zu anderen elastischen Systemen, wie Poly(dimethylsiloxan) (PDMS)²³³ oder Polyacrylamid²³⁴, einen wesentlich größeren Bereich der Elastizitätsvariation ermöglichen und einen deutlich höheren proteinabweisenden Charakter aufweisen, wurden diese elastischen Substrate zusätzlich, wie im nächsten Kapitel beschrieben, modifiziert. Der experimentelle Nutzen dieser Substrate wurde am Beispiel der Analyse des Adhäsionsverhaltens von *Plasmodium* Sporozoiten (Teil III) gezeigt.

^v Die Messungen wurden von Dr. Ilia Louban durchgeführt und ausgewertet.

5.2.3 Übertragung der Goldstrukturen auf glasebundene Hydrogele

Durch die hier vorgestellte Nanostrukturierung der Hydrogele mittels Goldpartikel wurden die kontrollierbaren Substrateigenschaften, wie die Elastizität, die hervorragende Kontrolle der Linkerdichte sowie insbesondere die spezifische Vorgabe der Linkerabstände zueinander, erweitert. In dieser Arbeit wurden die Gold-Nanopartikel mit unterschiedlichen Partikelabständen hergestellt und mittels cRGDfK bzw. cRGEfK durch Anbindung über einen Thiolanker funktionalisiert (Teil III). Diese zyklischen Oligopeptide zeichnen sich durch ihre große Relevanz für die Untersuchung von Zelladhäsionen aus. Der Nachweis der erfolgreichen Übertragung der in Kap. 5.2.1 charakterisierten Gold-Nanostrukturen auf die unterschiedlichen PEG-Hydrogeloberflächen erfolgte durch rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen. Da diese REM-Aufnahmen eine gewisse Leitfähigkeit der Substrate voraussetzen und diese sich ebenfalls für Anwendungen im Hochvakuum ($p \approx 10^{-5}$ mbar) eignen müssen, wurde im Falle der stark wasserhaltigen Hydrogele eine spezielle Cryo-Einheit verwendet. Aufgrund der sehr geringen Temperaturen (ca. -160 °C) und dem dabei entsprechend niedrigen Dampfdruck von Eis ($p_{\text{Eis}} < 1,4 \cdot 10^{-5}$ mbar) ist es möglich das benötigte Vakuum anzulegen ohne ein Verdampfen des Wassers zu induzieren²³⁵. Die Untersuchungen der Substrate im Cryo-REM zeigten eine optimale Übertragung der Nanostruktur durch kovalente Anbindung der Partikel über das in Kap. 4.1.7 und Kap. 4.1.9 beschriebene Linkersystem ohne Verlust der Ordnung (Abbildung 59).

Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Abstände der Partikel zueinander durch das Quellverhalten der Hydrogele in Abhängigkeit der Wahl des Polymers und der PEG-Konzentration der wässrigen Prä-Polymerisationslösung beeinflusst werden (Kap. 5.2.2). Die Quellrate (QR) umfasst einen Bereich von $QR_{\text{PEG-700-DA}} \approx 1$ bis $QR_{\text{PEG-35000-DA}} \approx 1,8$. Diese Raten wurden über die, durch den Quellvorgang bedingte, Volumenänderung der Hydrogele bestimmt und sind in der Literatur ²³⁶ aufgeführt. Die korrekten Partikelabstände lassen sich durch multiplizieren der Abstände auf

dem Übertragungsglas mit der Quellrate darstellen. Da zur experimentellen Anwendung in Teil III nur exakte Partikelabstände auf PEG-700-DA Hydrogelen von Relevanz waren und diese Hydrogele bei der verwendeten Konzentration nahezu kein Quellverhalten mehr aufweisen, wird hier nicht weiter darauf eingegangen.

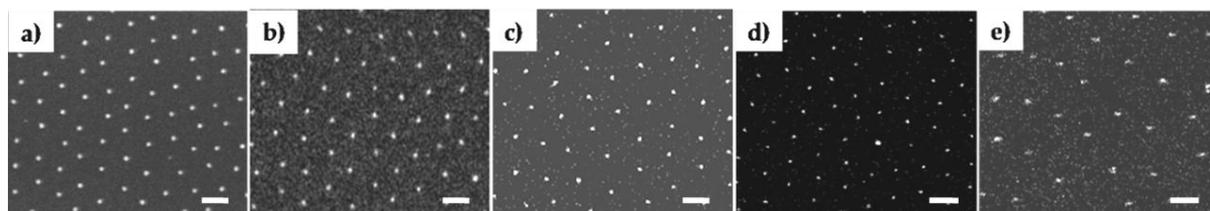


Abbildung 59: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gold-Nanostrukturen auf unterschiedlichen Substraten. a) zeigt rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme der Gold-Nanostruktur auf Glas, b) Cryo-REM Aufnahme der Gold-Nanostruktur auf einem PEG-700-DA Hydrogel, c) Cryo-REM Aufnahme der Gold-Nanostruktur auf einem PEG-10000-DA Hydrogel, d) Cryo-REM Aufnahme der Gold-Nanostruktur auf einem PEG-20000-DA Hydrogel und e) Cryo-REM Aufnahme der Gold-Nanostruktur auf einem PEG-35000-DA Hydrogel. Sämtliche hier gezeigten Hydrogele (b-e) waren kovalent an Glas gebunden. Der Maßstab entspricht 100 nm.

5.2.4 Stempeln von Mikrostrukturen auf Goldpartikel

Da PEG-beschichtete Oberflächen für ihre proteinabweisende Eigenschaft bekannt sind²³⁰⁻²³⁹, müssen für eine gezielte Anbindung von Proteinen frei zugängliche Ankerpunkte im Nanobereich auf dem PEG zur Verfügung gestellt werden²⁴⁰. Hier wurden quasi-hexagonal angeordnete Gold-Nanopartikel verwendet, um selektiv Biomoleküle auf ansonsten proteinabweisenden PEG-Hydrogelen zu immobilisieren. Die Verlinkung der Proteine wurde in einer mikrostrukturierten Anordnung durchgeführt. Diese partielle Bedeckung definierter Bereiche ermöglicht es neben der Generierung von Mikro-Nanostrukturen insbesondere unterschiedliche Proteine nebeneinander anzuordnen. Die Überstruktur auf der Nanostruktur kann durch Mikrokontakt-Drucken von thiolierten Komponenten erzeugt werden. Hier ist als Beispiel eine Beschichtung der Goldstruktur mittels HS-(CH₂)₁₁-EG₃-Biotin aufgeführt, welche in einem zweiten Schritt durch Aufstempeln von Streptavidin-

FITC weiter umgesetzt und somit fluoreszenzmikroskopisch visualisiert wurde (Abbildung 60). Neben dieser Darstellung wurde ebenfalls ein weiterer Ansatz verfolgt, in welchem zuerst das thiolierte Biotin gestempelt wurde und das Streptavidin-FITC anschließend homogen inkubiert wurde. Auch in diesem Fall wurde die bereits gezeigte Ausbildung der Mikrostruktur beobachtet. Durch die passivierende Wirkung des Hydrogels wird die exklusive Kopplung der Proteine an vorgegebene Bereiche realisiert. Ein weiterer Vorteil der Hydrogele ist im Falle der Anbindung von Proteinen durch das feuchte Milieu der Gele gegeben. Diese bieten beispielsweise durch vorherige Inkubation in PBS optimale Bedingungen für Proteine.

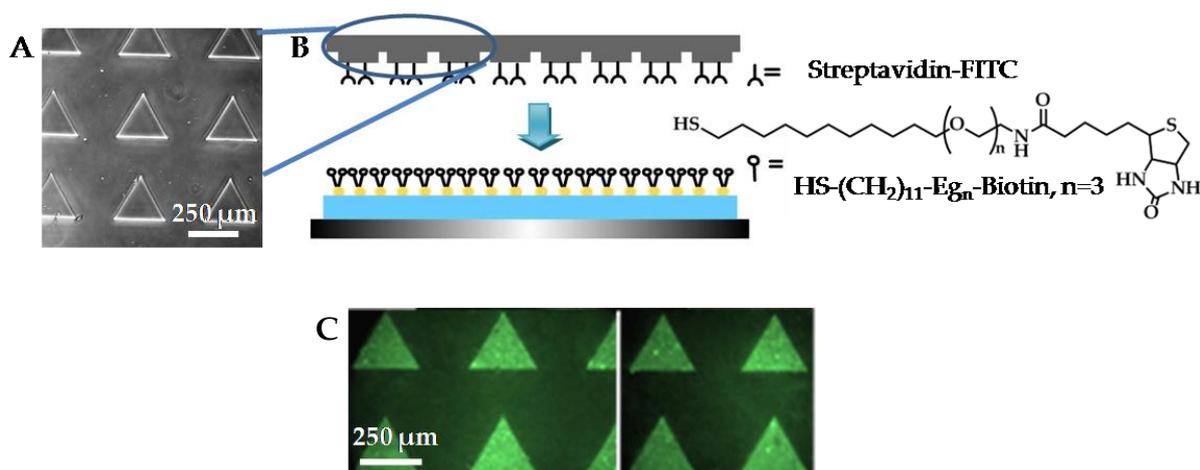


Abbildung 60: Mikrostrukturierte Anordnung von Proteinen auf Gold-Nanostrukturen. A) zeigt den zur strukturierten Abscheidung des hier verwendeten Streptavidin-FITC genutzten PDMS-Stempel. B) Schema des Stempelprozesses. Streptavidin-FITC wird in geordneter Struktur an Biotin gekoppelt, welches über eine Thiol-Endfunktion an die Goldpartikel gebunden ist. C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen visualisieren die strukturierte Anordnung des Streptavidin-FITC auf dem nanostrukturierten Hydrogel.

5.2.5 Variable Kombination der Parameter auf einem multivariablen Chip-Substrat

Im Folgenden wird näher auf die vielfältige Kombinationsmöglichkeit der einzelnen Parameter des entwickelten Hydrogelsystems eingegangen und anhand eines Beispiels (Abbildung 61) erläutert. Durch die unabhängige und spezifische Darstellung der einzelnen Parameter ist es möglich, für gezielte biologische Systeme einen entsprechenden Chip mit den erwünschten Parametern herzustellen. Diese Parameter umfassen folgende Bereiche, welche grundlegend eine bedeutende Rolle für die Erforschung und Kontrolle biologischer Zellsysteme und deren intrazellulären Vorgänge einnehmen:

- Proteinabweisende Hydrogeloberflächen mit unterschiedlichen Elastizitäten in einem umfangreichen Bereich von 0,6 kPa bis 6 MPa.
- Variierende Partikelabstände der Gold-Nanostrukturen, welche als dekorierende Struktur auf den proteinabweisenden Hydrogeloberflächen als spezifische Ankerpunkte dienen.
- Funktionalitäten, welche gezielt auf spezifische biologische Systeme abgestimmt werden können und in diesem System beispielsweise in Form einer Überstruktur durch Aufstempeln im Mikrometerbereich angeboten werden können (Abbildung 61 c).

Das hier beschriebene System stellt somit ein interessantes Modell zur Untersuchung biologischer Fragestellungen dar, indem es die wesentlichen Faktoren der extrazellulären Matrix imitiert. Die Herstellung des Substrats basiert je nach Größe und erwünschter Form auf einer „Sandwich“- bzw. Flusszellen- Technik, wodurch die luft- und blasenfreie Darstellung der kovalent an harte Substrate (wie Glas, oder Siliziumwafer) gebundenen Hydrogelschichten ermöglicht wird. Bei Anwendung dieser Technik erfolgen die Anbindung der Hydrogele und deren Dekoration durch die Gold-Nanostrukturen gemäß Kap. 4.1.9 innerhalb eines Polymerisationsschrittes.

Abbildung 61 erläutert den möglichen Aufbau eines kombinierten Substrates. Hier wird unter anderem ein Chip in einer Dimension einer 96-Loch-Zellkulturplatte vorgestellt, auf welchem sich drei unterschiedlich nanostrukturierte Hydrogelschichten mit diversen Elastizitäten von 0,6 kPa bis 6 MPa befinden (Abbildung 61 b). Diese Beschichtungen sind direkt nebeneinander positioniert und bieten somit eine verbesserte Handhabung sowie eine mögliche Anwendung einer automatischen Verknüpfungssteuerung bestimmter Mikroskope. Jedes Gel ist in diesem Fall mit zwei verschiedenen Partikelabständen (Partikeldichte) dekoriert (hier: 70 nm und 100 nm). Zur visuellen Darstellung wurden die Partikel hier mittels stromloser Abscheidung (*electroless deposition*) vergrößert, wodurch die Goldstrukturierten Bereiche aufgrund von Plasmonenabsorption rötlich erscheinen²⁴¹⁻²⁴³. Durch Anwendung der Mikrokontakt-Druck Technik können im Weiteren unterschiedliche Linkersysteme nebeneinander aufgetragen werden. Hier wurde beispielsweise Streptavidin-FITC über ein thioliertes Biotin an das Gold der Nanostrukturen gebunden (Abbildung 61 c). Ein zur Förderung der Zelladhäsion sehr häufig genutzter Linker stellt das zyklische Oligopeptid c(RGDfK)-thiol dar. Abbildung 61 d zeigt eine spezifische Zelladhäsion auf dem Bereich des Hydrogels, welcher mit einer c(RGDfK)-thiol funktionalisierten Gold-Nanostruktur versehen ist. Neben dieser Methode der Darstellung eines variablen Chips ist es ebenfalls möglich Hydrogele mit unterschiedlichen Elastizitäten in Form einzelner Felder zu generieren, welche jeweils mit spezifischen Partikelabständen strukturiert sind. Diese Felder können im Folgenden aufgrund ihrer räumlichen Trennung, beispielsweise in Form einer Tropfeninkubation, separat und unabhängig voneinander funktionalisiert werden (Abbildung 61 e).

Die hier präsentierten Systeme kombinieren die Vorteile der Erforschung biologischer Anwendungen auf weichen Substraten mit den Vorteilen von harten Substraten in Bezug auf ihre Handhabung, Mikroskopierbarkeit und Robustheit. Ein mikroskopischer Aufbau, bei welchem biologische Systeme durch das Substrat

hindurch betrachtet werden, ist für dieses Chipsubstrat komplikationslos möglich. Abbildung 61 f zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von REF52wt-Zellen, die fluoreszenzmarkiert wurden (Kap. 4.6.2). Neben diesen Zellen ist ebenfalls eine fluoreszenzmikroskopische Abbildung eines GFP-exprimierenden *Plasmodium* Sporozoiten dargestellt (Abbildung 61 g). Dieses Stadium des Malaria Parasiten wurde in dieser Arbeit durch Verwendung der entwickelten Hydrogelsysteme näher untersucht.

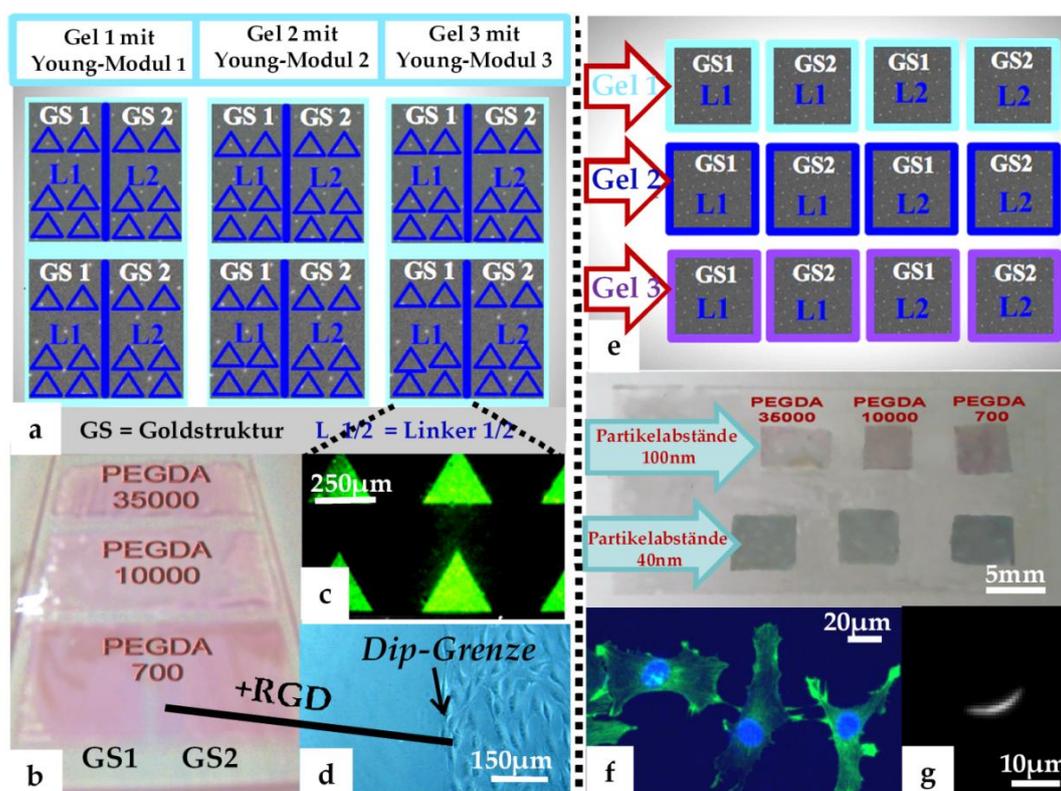


Abbildung 61: Darstellung einer möglichen Zusammenstellung eines Hydrogel-Chips: a) Hydrogel-Chip mit Geln unterschiedlicher Elastizitäten (von 0.6 kPa bis 6 MPa), variierenden Partikelabständen der Gold-Nanostrukturen und gestempelten Mikrobereichen von spezifischen, bioaktiven Liganden. b) Chip in einer Dimension einer 96-Loch-Zellkulturplatte. Es sind drei unterschiedlich nanostrukturierte Hydrogelschichten dargestellt, welche diverse Elastizitäten besitzen. Jedes Gel ist in diesem Fall mit zwei unterschiedlichen Partikelabständen dekoriert (hier: 70 und 100 nm). Um diese Struktur zur Darstellung zu visualisieren, wurden die Partikel mittels stromloser Abscheidung vergrößert (rötlich aufgrund von Plasmonenabsorption)^{241 - 243}. c) zeigt gestempelte Protein-Mikrostrukturen. Streptavidin-FITC wurde über ein thioliertes Biotin an das Gold der Nanostrukturen gebunden. d) REF52wt Zellen auf partiell nanostrukturierten und mit [c(RGDfK)-thiol] funktionalisierten Hydrogelen. e) zeigt einzelne Felder mit unterschiedlich elastischen Hydrogelen. Jedes besitzt spezifische Partikelabstände, welche unabhängig voneinander

funktionalisiert werden können. Auch hier ist die Nanostruktur mittels stromloser Abscheidung vergrößert dargestellt. f) Fluoreszenzaufnahme von fluoreszenzmarkierten REF-Zellen auf nanostrukturierten Hydrogelen. g) Fluoreszenzaufnahme eines GFP-exprimierenden *Plasmodium* Sporozoiten auf nanostrukturiertem Hydrogel (Partikelabstand: 70 nm). Beide Fälle (f, g) zeigen, dass die Mikroskopie durch die Probe hindurch möglich ist.

5.3 Funktionalisierung der Hydrogele mittels Carboxy-funktionen

5.3.1 Partielle Funktionalisierung der Hydrogeloberflächen

Die partielle Funktionalisierung der Hydrogele mittels Carbonsäure basiert auf einem Übertragungsprozess, bei welchem langkettige ungesättigte Fettsäuren auf einem Plasma-aktivierten Glassubstrat abgeschieden werden. Im Folgenden wird das ungesättigte Ende der Säure durch Kreuzpolymerisation mit einer wässrigen Lösung des PEG-DA-Makromers oberflächlich in das PEG-Hydrogel eingebunden (Kap. 4.1.14). Durch diese Vorgehensweise werden nur in einem gezielten Bereich Carboxy-Funktionen generiert. Diese freistehenden Carboxy-Gruppen können im Weiteren durch vielfältige Folgereaktionen umgesetzt werden und dienen beispielsweise zur spezifischen, kovalenten Anbindung von Proteinen. Zahlreiche zelluläre Abläufe, wie embryonale Entwicklung²⁴⁴, Genexpression²⁴⁴ und die Fortbewegung der Zelle basieren auf Adhäsionen und Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Das Angebot von gerichtet und definiert funktionalisierten Grenzflächen stellt somit eine interessante Möglichkeit für die Untersuchung von Protein-Transmembranrezeptor-Wechselwirkungen dar. Eine solche Kopplung diverser EZM-Proteine, wie unter anderem Fibronectin und Kollagen, wurde auch in dieser Arbeit zur Untersuchung des Adhäsions- und Bewegungsverhaltens von Malaria Parasiten (Teil III) durchgeführt.

Die erfolgreiche Übertragung und Generierung der funktionellen Gruppen auf dem generell proteinabweisenden Hydrogel wurde durch Ankopplung von Fibronectin-TRITC fluoreszenzmikroskopisch visualisiert (Abbildung 62 B). Die Größe des Carbonsäure-dekorierten Bereichs ist abhängig von der Eintauchtiefe des Übertragungsglases in die Carbonsäurelösung (Abbildung 62 A).

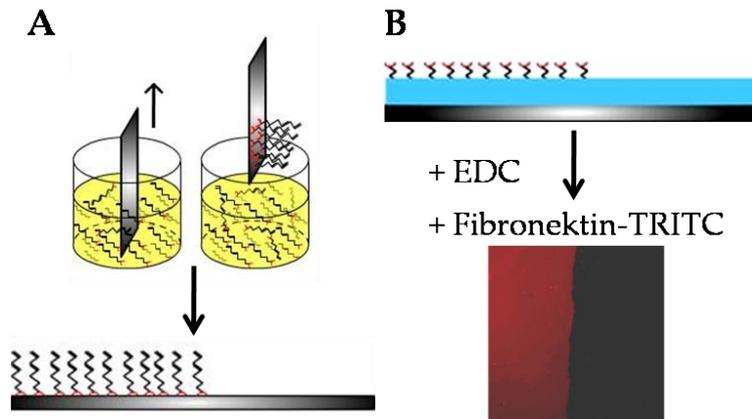


Abbildung 62: A) Die Eintauchtiefe des Übertragungsglases bestimmt die Größe des funktionalisierten Bereichs. B) Nach Übertragung der Säurefunktion auf das Hydrogel (hier: PEG-700-DA Hydrogel), wurde die Carboxyfunktion zur Visualisierung mittels EDC aktiviert und anschließend fluoreszenzaktives Fibronectin-TRITC angekoppelt (rot).

Als ergänzende Methode zur Überprüfung der halbseitigen, oberflächlichen Funktionalisierung des Hydrogels durch Carbonsäure wurden Wassertropfen auf den verschiedenen Bereichen des Substrates abgelegt und die Kontaktwinkel dieser Tropfen vermessen. Auf dem Bereich des reinen PEG-700-DA Hydrogels formierten sich die Tropfen mit Kontaktwinkeln von ca. 40-41°, während sich auf den Carboxy-funktionalisierten Bereichen aufgrund der stark hydrophilen Eigenschaft dieser Oberfläche keine Tropfen ausbilden konnten (Abbildung 63).

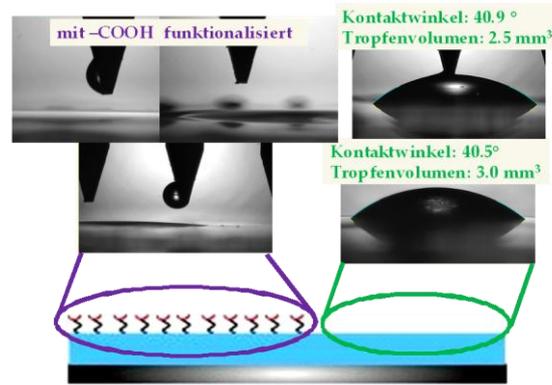


Abbildung 63: Kontaktwinkelmessungen auf halb-funktionalisierten Hydrogelsubstraten (hier: PEG-700-DA Hydrogel). Links: Auf dem Carboxy-funktionalisierten Bereich des Hydrogels ist eine Tropfenbildung aufgrund der stark hydrophilen Eigenschaft nicht möglich. Rechts: Auf reinem PEG-700-DA Hydrogel lässt sich ein Tropfen ausprägen und vermessen.

Die passivierende Wirkung des reinen Hydrogels im Kontrast zum Carboxy-funktionalisierten Bereich wurde durch das Setzen von REF52wt-Zellen auf das Substrat verdeutlicht. Nach Ankopplung von Fibronectin an die Carbonsäurefunktion konnten die Zellen lediglich auf diesem Bereich adhären. Auf dem reinen Hydrogel wurden keine adhären Zellen beobachtet (Abbildung 64).

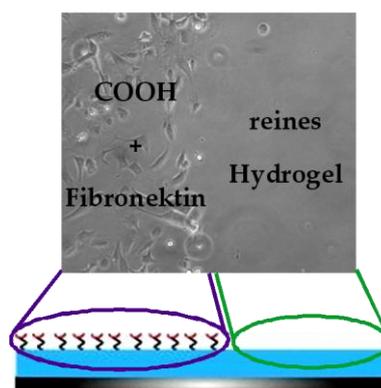


Abbildung 64: Nach Anbindung von Fibronectin an die Carboxyfunktionen wurde eine Zelladhäsion der REF52wt-Zellen lediglich auf diesem funktionalisierten Bereich des Hydrogels beobachtet.

Dieses Verhalten wurde ebenfalls bei den in Teil III verwendeten Malaria Parasiten beobachtet. Eine Adhäsion und Bewegung der *Plasmodium* Sporoziten war nur auf dem mit Proteinen umgesetzten, Carbonsäure-funktionalisierten Bereich möglich. Auf dem reinen Hydrogel zeigten die Parasiten keine Adhäsions- oder Bewegungsfähigkeit (siehe Teil III).

5.3.2 Funktionalisierung von Hydrogelen in mikrostrukturierter Anordnung

Basierend auf dem in Kap. 4.1.16 und Kap. 5.3.1 beschriebenen Übertragungsprozess ist es möglich Carbonsäurefunktionen in einer mikrostrukturierten Anordnung auf dem proteinabweisenden Hydrogelsubstrat zu generieren. Hier wurde das Prinzip am Beispiel von funktionalisierten Bereichen in Form von Mikrokreisen mit einem Außendurchmesser von 100 µm demonstriert. Hierfür wurden hydrophobe PDMS-Stempel in einer entsprechenden Lösung von Linolensäure in Ethanol inkubiert. Das folgende Mikrokontakt-Drucken auf ein hydrophiles Übertragungsglas bewirkte eine Ausrichtung der Säure in einer Weise, in welcher das ungesättigte Ende vom Glas weggerichtet ist (Kap. 4.1.14). Die in dieser Art mikrostrukturiert angeordnete Säure wurde anschließend wie in Kap. 4.1.16 beschrieben oberflächlich in das Hydrogel (hier: PEG-700-DA Hydrogel) eingebunden. Eine EDC-aktivierte Kopplung von Fibronectin-TRITC (rot) an die Carboxyfunktionen ermöglichte die fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Strukturen und veranschaulichte somit den erfolgreichen Übertrag und damit die Anordnung der Carbonsäurefunktionen auf dem Hydrogel in mikrostrukturierter Weise (Abbildung 65).

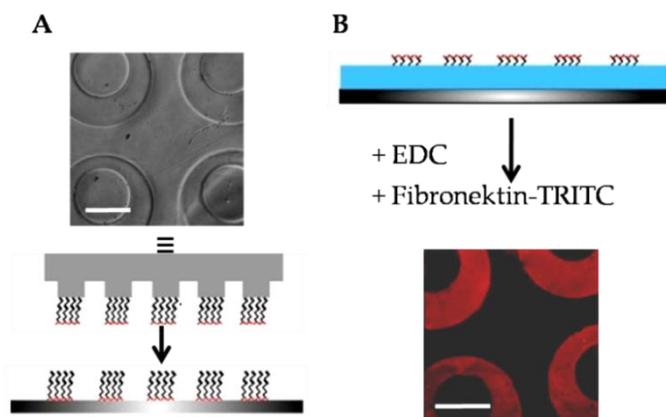


Abbildung 65: Der Carboxy-funktionalisierte Bereich des Hydrogels wurde zur Visualisierung mit TRITC-markiertem Fibronektin verlinkt (rot). A) zeigt den PDMS-Stempel, welcher zur mikrostrukturierten Dekoration des Transferrglases mittels Linolensäure verwendet wurde. B) Nach Transfer der Struktur auf das Hydrogel, wurde Fibronektin-TRITC lediglich an die carboxylierten Mikrostrukturen gebunden (rot). Der Maßstab entspricht 50 μm .

5.4 Strukturierung gekrümmter Oberflächen

Die Gold-Nanostrukturierung der gekrümmten Oberflächen von Glasfasern, konnte bekanntermaßen^{228,245} nicht unter gleichen Bedingungen hergestellt werden wie im Falle planarer Glassubstrate (wie Deckgläser). Da die Krümmung der Oberfläche ein Reißen des Mizelllösungsfilms bedingt, kommt es zur Inselbildung kleiner ungeordneter, nanostrukturierter Bereiche, während andere Bereiche der Oberfläche keinerlei Strukturierung bzw. Partikelabscheidung aufweisen (Abbildung 66 links). Nachdem gezeigt wurde, dass die Bildung der Struktur durch Verwendung einer speziellen Tropfentechnik und somit durch Generierung eines dickeren Mizellfilms durch schnellere Auftragung des Films (Kap. 2.2.7) über die gesamte Oberfläche erfolgreich war, wurde eine spezielle Hochgeschwindigkeits-Tauchapparatur entwickelt. Mit Hilfe dieser Tauchvorrichtung wurden die Geschwindigkeiten, mit der die Substrate aus der Mizelllösung gezogen wurden, kontrolliert, definiert und gleichmäßig variiert. Die Ordnung und Partikelabstände der in dieser Weise auf der

gekrümmten Oberfläche erfolgreich hergestellten Strukturen (Abbildung 66 rechts) wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert.

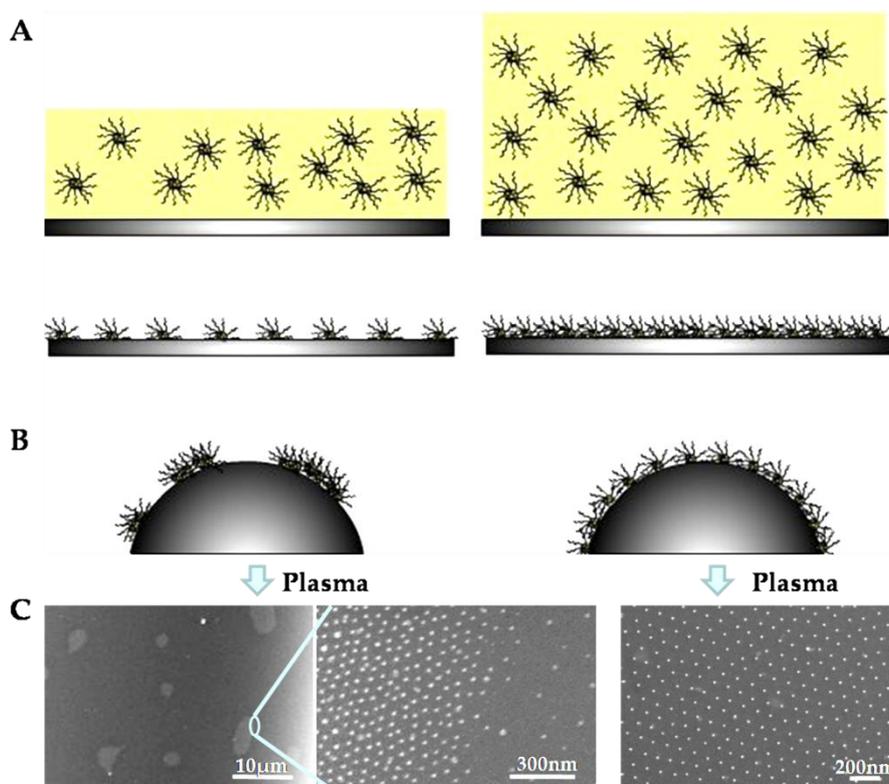


Abbildung 66: Strukturbildung auf flachen und gekrümmten Oberflächen in Abhängigkeit der Mizellfilmdicke A) Formierung der Mizellen auf ebenen Glassubstraten in Abhängigkeit der Filmdicke der Mizelllösung. B) Formierung der Mizellen auf gekrümmten Glassubstraten ($d = 70 \mu\text{m}$) (Glasfasern) in Abhängigkeit der Filmdicke der Mizelllösung. C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gold-Nanostrukturen nach Plasmabehandlung der entsprechenden Mizellformierungen auf Glasfasern (hier: Polymer $\text{PS}(110000)\text{-}b\text{-P2VP}(52000)$, Beladung 0,5). Der Ordnungsparameter Ψ beträgt 0,78.

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden die Glasfasern über die gesamte Länge hinweg betrachtet und die Gleichmäßigkeit der Nanostrukturen überprüft. Tabelle 9 führt die entsprechenden Abstände und Ordnungsparameter am Beispiel zweier Mizelllösungen auf. Dabei wurden Glasfasern mit Durchmessern von $70 \mu\text{m}$ (Ätzzeit in HF = 17 min) mittels Hochgeschwindigkeits-Tauchvorrichtung mit den beschriebenen Geschwindigkeiten (Kap. 4.1.3, Tabelle 9) aus den goldbeladenen

Mizellösungen gezogen. Selbst auf gekrümmten Oberflächen wurden auf diese Weise, je nach Wahl des Polymers und der Geschwindigkeit, unterschiedliche Goldpartikelabstände generiert. Dabei erwiesen sich die Ordnungsparameter dieser Nanostrukturen als außerordentlich hoch.

Tabelle 9: Strukturierungswerte der Hochgeschwindigkeits-Tauchvorrichtung am Beispiel zweier Mizellösungen bei einem Glasfaserdurchmesser von 70 μm . A = Partikelabstände, Ψ = Ordnungsparameter.

Polymer	8V \equiv 5,9 mm/sek	16V \equiv 13,0 mm/sek	24V \equiv 20,3 mm/sek
PS(110000)-b-P2VP(52000)	$A = 100 \text{ nm}$, $\Psi = 0,62$ (a)	$A = 95 \text{ nm}$, $\Psi = 0,61$ (b)	$A = 85 \text{ nm}$, $\Psi = 0,68$ (c)
PS(216000)-b-P2VP(60000)	$A = 175 \text{ nm}$, $\Psi = 0,56$ (d)	$A = 145 \text{ nm}$, $\Psi = 0,72$ (e)	$A = 135 \text{ nm}$, $\Psi = 0,74$ (f)

Abbildung 67 zeigt entsprechende rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der strukturierten Glasfasern, welche in Tabelle 9 beschrieben wurden.

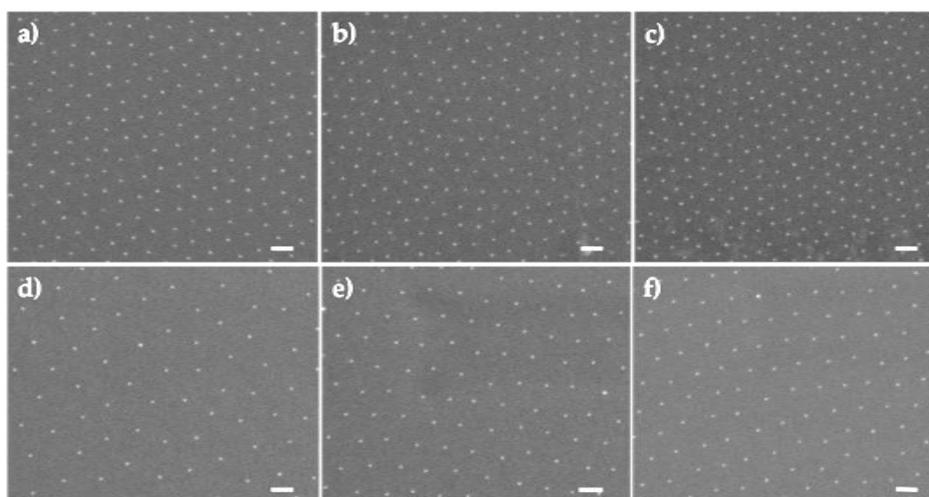


Abbildung 67: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nanostrukturierten Glasfasern (Durchmesser 70 μm), welche in Tabelle 9 aufgeführt sind. Der Maßstab entspricht 100 nm.

Durch Ätzen der Glasfasern mit ursprünglichem Durchmessern von $120\ \mu\text{m}$ mittels Flusssäure (Kap. 4.1.4) wurden Glasfasern mit Durchmessern von $70\ \mu\text{m}$ (Zeit in HF = 17 min, siehe oben), $50\ \mu\text{m}$ (Zeit in HF = 36 min) und $10\ \mu\text{m}$ (Zeit in HF = 48 min) hergestellt. Im Folgenden wurde die Strukturbildung der Goldpartikel auf den unterschiedlichen Fasern mit entsprechend variierend starker Krümmung untersucht. Dabei zeigte sich durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eine erfolgreiche Strukturierung bei hohen Zuggeschwindigkeiten von $\sim 34\ \text{mm/s}$ (40 V) (Abbildung 68). Im Falle der Fasern mit einem Durchmesser von $50\ \mu\text{m}$ wurde eine gleichmäßige Strukturierung beobachtet (Abbildung 68 a), während bei den stärker gekrümmten Glasfasern mit $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser eine deutliche Einschränkung der Strukturierungsfähigkeit bei gleicher Geschwindigkeit zu beobachten war. Ein zu beachtender Effekt trat nach direkter Strukturierung der Fasern nach Ätzen in HF und anschließendem Waschen mit Wasser auf. Hier kamen deutliche Fehlstellen zum Vorschein (Abbildung 68 b unten). Durch Waschen der Fasern nach dem Ätzprozess in Caro'scher Säure oder durch Aktivierung im Plasma wurde auch im Fall der dünneren Fasern ($10\ \mu\text{m}$) eine flächendeckende Strukturierung erzielt (Abbildung 68 c). Jedoch besitzt diese Struktur eine geringere Ordnung ($d = 10\ \mu\text{m}$, $\Psi = 0,39$) als die Struktur auf den Fasern mit Durchmessern von $50\ \mu\text{m}$ ($\Psi = 0,58$). Es ist offensichtlich, dass mit zunehmender Krümmung ein Ausgleich durch Erhöhung der Zuggeschwindigkeit und somit Vergrößerung der Dicke des mizellaren Lösungsmittelfilms nötig ist, um eine gleichmäßige und flächendeckende Strukturierung mittels Diblock-Copolymer-Mizell-Lithographie zu erreichen und einem Reißen des Mizelllösungsfilms entgegenzuwirken. Eine umfangreiche Charakterisierung der Zuggeschwindigkeiten zur Bildung wohlgeordneter Nanostrukturen auf einer Vielzahl von unterschiedlich dicken bzw. gekrümmten Glasfasern sollte in zukünftigen Experimenten noch vollendet werden.

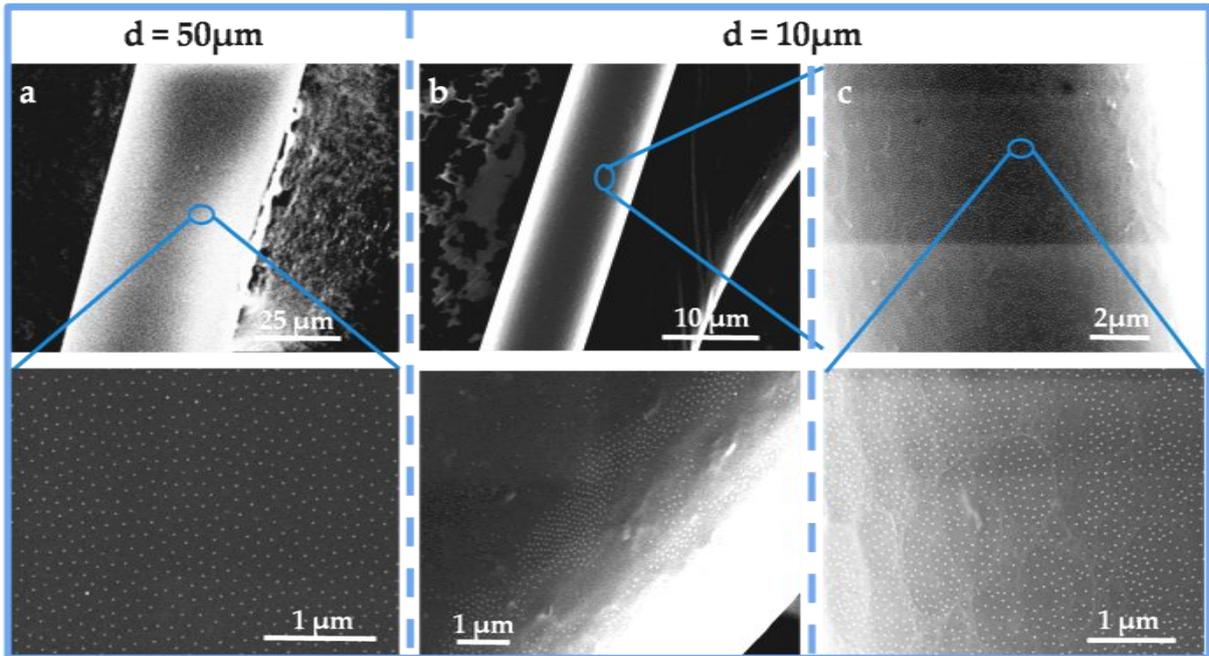


Abbildung 68: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-nanostrukturierten Glasfasern mit unterschiedlichen Durchmessern. Alle hier abgebildeten Fasern wurden mit einer Zuggeschwindigkeit von ~ 34 mm/s strukturiert. a) Die Glasfaser mit einem Durchmesser von $50 \mu\text{m}$ (oben) zeigt eine gleichmäßige Struktur der Goldpartikel (unten). b) Glasfaser mit $10 \mu\text{m}$ Durchmesser (oben). Unten: Eine Strukturierung direkt nach Ätzen der Faser mittels HF (hydrophob) bewirkt Fehlstellen. c) Durch Aktivieren mittels Plasma oder Caro'scher Säure (hydrophil) der Faser nach dem Ätzprozess (HF) wird die flächendeckende Struktur deutlich verbessert.

Teil III Biologische Anwendung

5.5 *Plasmodium* Sporozoiten auf multivariablen Hydrogelsystemen

Unter Verwendung der entwickelten multivariablen Hydrogelsysteme (Teil II) wurde im Folgenden das Adhäsions- und Bewegungsverhalten von *Plasmodium berghei* Sporozoiten auf verschiedenen elastischen, nanostrukturierten und spezifisch funktionalisierten Hydrogelsubstraten untersucht. Diese Experimente erfolgten in Kooperation mit Janina Hellman aus der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Frischknecht. Hierzu diente der in Abbildung 69 skizzierte Versuchsaufbau.

Nach Adhäsion der Sporozoiten auf einem Substrat folgen zunächst weitere Schritte, bevor die Parasiten beginnen, sich durch einen Gleitmechanismus zu bewegen²⁴⁶. Die Bewegung der Parasiten *ex vivo* erfolgt aufgrund ihrer Sichelform hauptsächlich in einer kreisförmigen Weise²⁴⁷, jedoch zeigen Sporozoiten ebenfalls eine geringe Anzahl anderer Bewegungsformen (Abbildung 69 b). Um die unterschiedlichen Bewegungsmuster automatisch zu klassifizieren wurde eine kürzlich in der Gruppe von Dr. Frischknecht (Hygieneinstitut Heidelberg) entwickelte Methode genutzt, welche die Parasiten erfasst, deren zurückgelegten Weg bestimmt und sie zuverlässig in Abhängigkeit ihrer Bewegungsart separiert²⁴⁶.

Auf reinen Glassubstraten ließen sich somit folgende Beobachtungen quantifizieren. Ca. 10% der Sporozoiten, welche aus Speicheldrüsen von Mücken isoliert wurden, hafteten auf dem Substrat ohne eine Bewegung auszuführen („gebunden“ = „attached“), während etwa 30 % gebunden waren und dabei eine wippende Bewegung ausführten. Bei dieser Form der Bewegung sind die Parasiten nur mit einer Spitze gebunden und bewegen sich mit dem freien Ende in einer zusätzlich rotierenden Form um die Kontaktstelle auf und ab („waving“). Diese aktive Form ist Aktin-abhängig^{246,247}. 50% der Sporozoiten bewegten sich in einer kreisenden Form, wobei der Großteil aufgrund der Beobachtung durch ein

invertiertes Mikroskop gegen den Uhrzeigersinn (GUZS) kreiste (Abbildung 69 C, Abbildung 70). Die Durchschnittsgeschwindigkeit rechtsgängig kreisender Sporozoiten (auf Glas) lag bei $1,4 \mu\text{m/s}$.

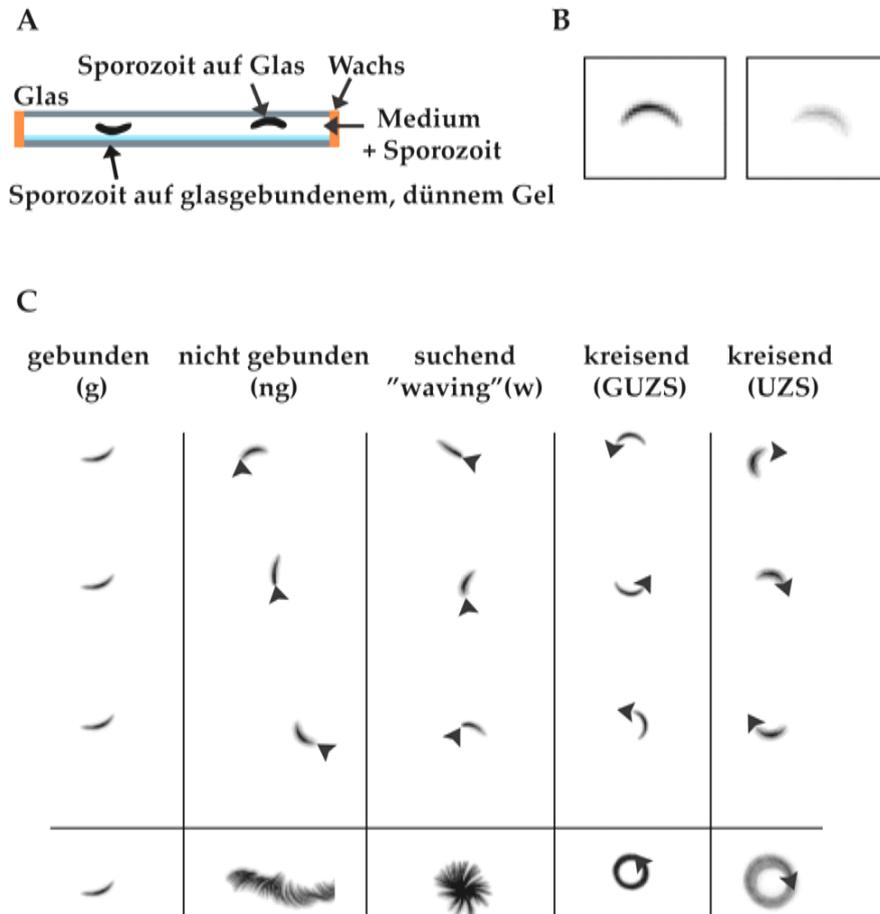


Abbildung 69: A) Schematische Darstellung des Hydrogel-Glas „Sandwich“-Versuchsaufbaus. B) *P. Berghei* Sporozoiten, welche zytoplasmatisches GFP exprimieren und sich auf dem Hydrogel bewegen sind im Fokus (links). Dagegen erscheinen Sporozoiten, welche sich auf dem Gegenglas bewegen verschwommen. C) Invertierte Zeitrafferaufnahmen (ersten drei Zeilen) von gebundenen (g), nicht gebundenen (ng), suchenden (w = "waving"), gegen den Uhrzeigersinn kreisenden (GUZS) Sporozoiten auf Hydrogel. *Plasmodium berghei* Sporozoiten, welche sich nicht auf dem Gel befinden, lassen sich von denen auf dem Gel unterscheiden. Sie kreisen im Uhrzeigersinn (UZS) und sind nicht im Fokus. Die letzte Zeile stellt die Gesamtprojektion der unterschiedlichen Bewegungsformen dar.

5.5.1 Bewegungsverhalten von *Plasmodium* Sporozoiten auf reinen PEG-DA-Hydrogelen

In Gegenwart von BSA (Bovine Serum Albumin) bewegen sich Sporozoiten auf einer Vielzahl von Substratoberflächen, einschließlich elastischer Substrate wie Polyacrylamid. Dabei ist eine Bindung an extrazelluläre Matrixproteine nicht relevant²¹⁵.

Die hier durchgeführten Experimente zeigten, dass sich isolierte Speicheldrüsensporozoiten unter Zusatz von BSA ebenfalls auf Hydrogelen bewegten (Abbildung 69, Abbildung 70). Diese erwiesen sich zuvor unter gleichen Herstellungsbedingungen, bei einer UV-Polymerisationszeit von 35 Minuten, abweisend gegenüber anderen Zelltypen, wie Fibroblasten (siehe Teil II).

Es zeigte sich, dass sich die Parasiten im Falle des PEG-700-DA Hydrogels sogar in größerer Anzahl und mit einer höheren Geschwindigkeit bewegten.

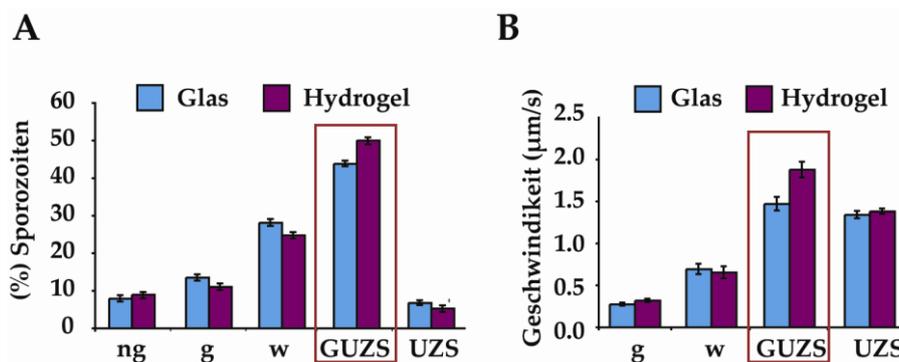


Abbildung 70: Sporozoitenbewegung auf Glas und auf PEG-700-DA-Hydrogel (Polymerisationszeit: 35 Minuten). A) Ungewöhnlicherweise gleiten die Parasiten auf dem Hydrogel in kreisender Bewegung (GUZS), sogar in höherer Anzahl als auf Glas. B) Sporozoiten, welche auf dem Hydrogel kreisten, zeigten eine höhere Geschwindigkeit als auf Glas.

In sämtlichen folgenden Experimenten wurde auf die Auswertung und Aufführung der im Uhrzeigersinn kreisenden (UZS) Parasiten verzichtet, da sich diese lediglich auf dem Gegenglas befanden und somit keine Relevanz für experimentelle Aussagen besitzen.

5.5.2 Analyse von *Plasmodium* Sporozoiten auf reinen PEG-DA-Hydrogelen mit unterschiedlichen Elastizitäten

Die Tatsache, dass sich die *Plasmodium berghei* Sporozoiten bei Zugabe von BSA auf Hydrogelen bewegen wurde genutzt, um den Einfluss unterschiedlicher Elastizitäten auf das Adhäsions- und Bewegungsverhalten der Parasiten zu untersuchen. Hierzu wurde ein weites Spektrum der in Teil II vorgestellten Hydrogele mit unterschiedlichen Youngschen Modulen eingesetzt und die Bewegungsfähigkeit der Sporozoiten auf den Gelen (35 Minuten Polymerisationszeit) überprüft (siehe Kap. 5.5.1, Abbildung 70). Fluoreszenzaufnahmen der Parasiten auf den unterschiedlich elastischen (festen) Gelen (Zeitraffer, über 100 Sekunden) zeigten auf PEG-700-DA Gelen, welche ca. der Härte von Zellkulturplastik entsprechen, eine hohe Anzahl an sich kreisend und schnell fortbewegender Sporozoiten (Abbildung 71). Auf PEG-Gelen mit zunehmender Elastizität wurde weniger Fortbewegung der Sporozoiten, dagegen eine hohe Anzahl von sogenannten „wavern“ (einseitig gebunden, Bewegung erfolgt um den Adhäsionspunkt) beobachtet (Abbildung 71 A, B, PEG-10000-DA) sowie „nicht-gebundener“ (versuchen zu adhären und schaffen es nicht - „wobbeln“ auf der Stelle oder driften weg) Parasiten (Abbildung 71 A, B, PEG-20000-DA, PEG-35000-DA) beobachtet. Offensichtlich ist es den Sporozoiten in diesen Fällen nicht möglich, die Adhäsion auf der Substratoberfläche vollständig auszuführen, oder die Adhäsion zur Fortbewegung schnell genug zu lösen. Mit zunehmender Inkubationszeit (Verweilzeit) der Sporozoiten auf dem Substrat stieg die Anzahl der sich aktiv bewegenden Sporozoiten auf den weicheren Gelen (Abbildung 71 C, D). Während sich nach 10 Minuten auf dem PEG-10000-DA-Gel lediglich 20 % der Sporozoiten aktiv und kreisend bewegten, betrug die Anzahl der kreisenden Sporozoiten nach 60 Minuten 45 %. Auffallend hierbei ist die Abnahme der Anzahl von „nicht-gebundenen“ Parasiten und insbesondere der „waver“ (Abbildung 71 D). Ähnlich erwies sich ebenfalls das Verhalten der Parasiten auf PEG-20000-DA-Gelen. Hier

kreisten nach 10 Minuten nur 5%, wohingegen die Anzahl nach 60 Minuten auf 36 % anstieg (Abbildung 71 C, D). Entsprechend nahm die Anzahl der „nicht-gebundenen“ Sporozoiten ab. Auf PEG-35000-DA-Gelen, welche eine Elastizität aufweisen, die beträchtlich weicher als sämtliche Umgebungen *in vivo* ist, wurde generell ein stark eingeschränktes Adhäsions- und Bewegungsverhalten beobachtet (Abbildung 71 C, D). Die Betrachtung der Geschwindigkeit ergab eine Erhöhung auf PEG-700-DA-Gelen verglichen mit Sporozoiten auf Glas (Abbildung 71 E). Des Weiteren zeigte sich jedoch eine Abnahme der Geschwindigkeit kreisender Sporozoiten mit zunehmender Elastizität der Gele.

Dies deutet auf eine erschwerte und insbesondere deutlich zeitverzögerte Ausbildung der Adhäsionskontakte aufgrund der zunehmenden Elastizität der Substrate hin.

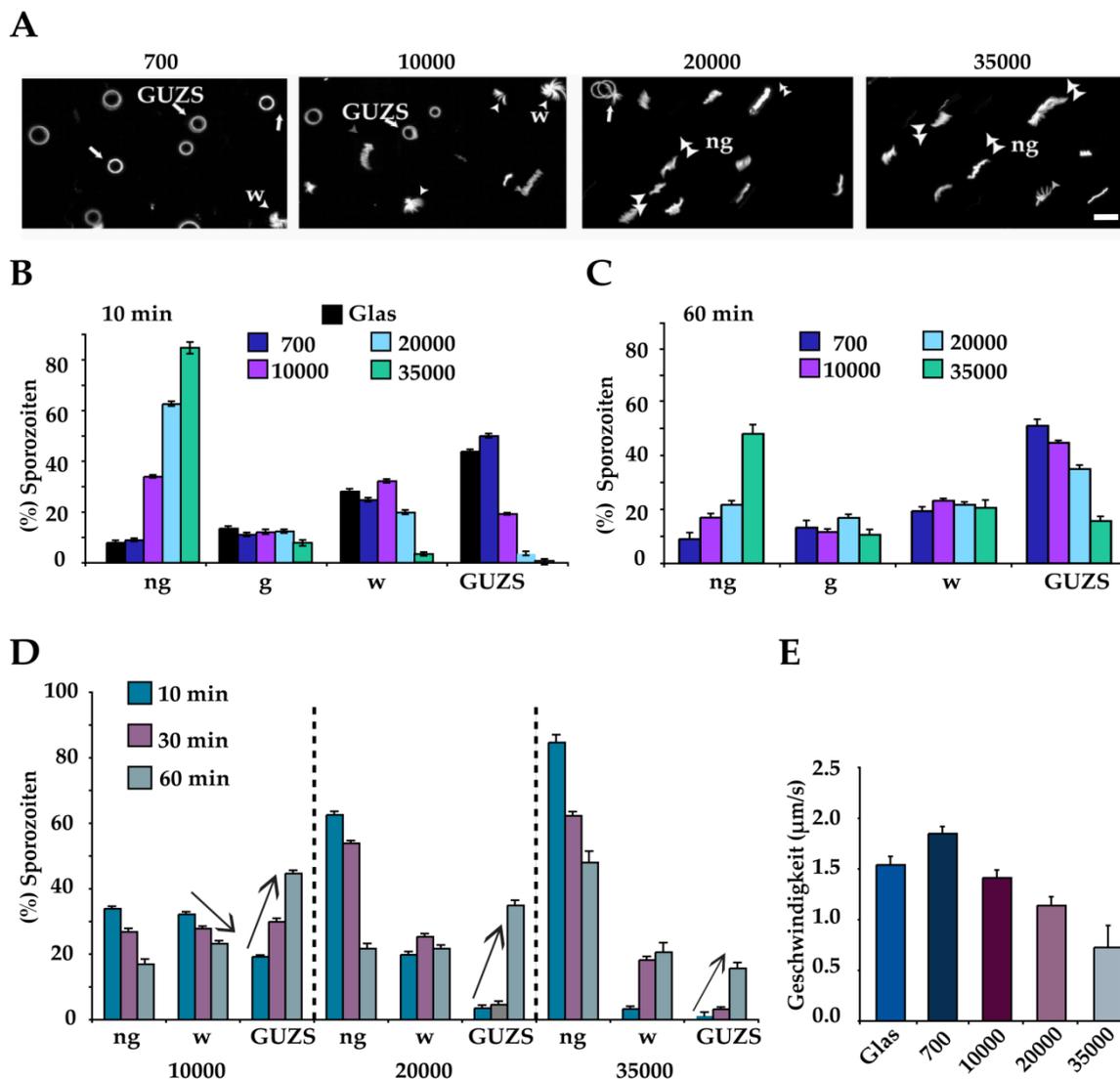


Abbildung 71: Sporozoitenbewegung auf unterschiedlichen PEG-DA-Gelen. A) Gesamtprojektion der Fluoreszenzaufnahmen von Sporozoiten auf unterschiedlich festen Hydrogelen. Die Zahl stellt das jeweilige Molekulargewicht der PEG-DA-Gele dar. GUZS: gegen den Uhrzeigesinn kreisende Sporozoiten (aufgrund invertierter Mikroskopieaufnahmen), ng: „nicht gebundene“ (schwimmende) Sporozoiten, w: „waver“ (einseitig gebunden, um die Kontaktstelle rotierende auf und ab Bewegung). B, C) Quantitative Auswertung der Sporozoiten-Bewegung auf unterschiedlich festen Hydrogelen nach 10 Minuten (B) und 60 Minuten (C). D) Zusammenstellung der Sporozoitenbewegung auf unterschiedlich elastischen Hydrogelen in Abhängigkeit der Zeit. E) Gemittelte Geschwindigkeit der sich aktiv bewegenden Sporozoiten auf den jeweiligen Hydrogelen. Der Maßstab entspricht 20 μm .

5.5.3 Analyse von *Plasmodium* Sporozoiten auf elastischen Substratoberflächen unter Einfluss von Jasplakinolid

Die Polymerisation von Aktin spielt eine bedeutende Rolle bei der Migration von *Plasmodium berghei* Sporozoiten²¹⁵. Diese Tatsache führte zu der Überlegung ob Jasplakinolid (Jas), welches die Depolymerisation von Aktin hemmt und somit eine Erhöhung des Anteils von filamentösem Aktin bewirkt, die Sporozoitenbewegung auf elastischen/ weichen Substraten beeinflusst.

Quantitative Analysen der Bewegungsmuster auf PEG-700-DA-Hydrogelen zeigten, dass geringe Konzentrationen von Jas (50 nM) einen hemmenden Effekt auf die Anzahl der beweglichen Sporozoiten oder auf deren Geschwindigkeit hatten. Dies ähnelte den bekannten Ergebnissen auf Glas²¹⁵.

Auf PEG-10000-DA Hydrogelen kreisten dagegen ca. doppelt so viele Sporozoiten unter Einfluss von Jas (50 nM) als ohne Zugabe von Jas (Abbildung 72: C). Nach 60 Minuten war jedoch auch hier kein bedeutender Unterschied zwischen den Populationen mehr ersichtlich (Abbildung 72 C). Die Geschwindigkeit der Sporozoiten auf PEG-10000-Hydrogelen wurde durch die Wirkung von Jas ebenfalls kurzzeitig bei Inkubationszeiten von 10 und 30 Minuten erhöht (Abbildung 72 D). Bei höheren Konzentrationen von Jas (150 nM) wurde kein ausgleichender Effekt des weichen Substrats mehr beobachtet. Stattdessen wurde der auf Glas bekannte inhibitorische Effekt des Wirkstoffs beobachtet.

Der Einfluss von Jas auf die Vitalität der Sporozoiten war auf PEG-20000-Hydrogelen noch ausgeprägter (Abbildung 72 B, E). Hier kreisten nach 10 Minuten ohne Jas lediglich 4 % und in Gegenwart von Jas 19 %. Dies entsprach einer Zunahme um mehr als das Vierfache, wobei der Anteil der kreisenden Sporozoiten nach 30 Minuten entsprechend sogar von 5 % ohne Jas auf 28 % mit Jas (50 nM) anstieg (Abbildung 72 E). Bei 60-minütiger Inkubation wurde die Gleitbewegung der Sporozoiten geringfügig auf eine Prozentzahl von 30% gehemmt. Auffallend war die eindeutige Zunahme der Prozentzahl an „gebundenen“ Sporozoiten bei sämtlichen

Inkubationszeiten unter Zugabe von Jas (50 nM). So scheint die Wirkung von Jas die Adhäsionsbildung auf weichen Substraten deutlich zu unterstützen und den Einfluss der elastischen Umgebung auf die Sporozoiten zu kompensieren. Hierbei wirkt sich jedoch eine lange Inkubationszeit (60 Minuten) trotz Adhäsionsförderung hemmend in Bezug auf das Gleitverhalten aus. Das Ausmaß der Aktin-Polymerisation in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration und Zeit scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Hohe Konzentrationen von Jas (150 nM) führten auf allen Substraten zum bekannten inhibitorischen Effekt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass gezielte Förderung der Aktin-Polymerisation in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration des eingesetzten Wirkstoffs (Jas) die Gleitbewegung der Sporozoiten auf weichen Substratoberflächen stimulieren und stabilisieren kann.

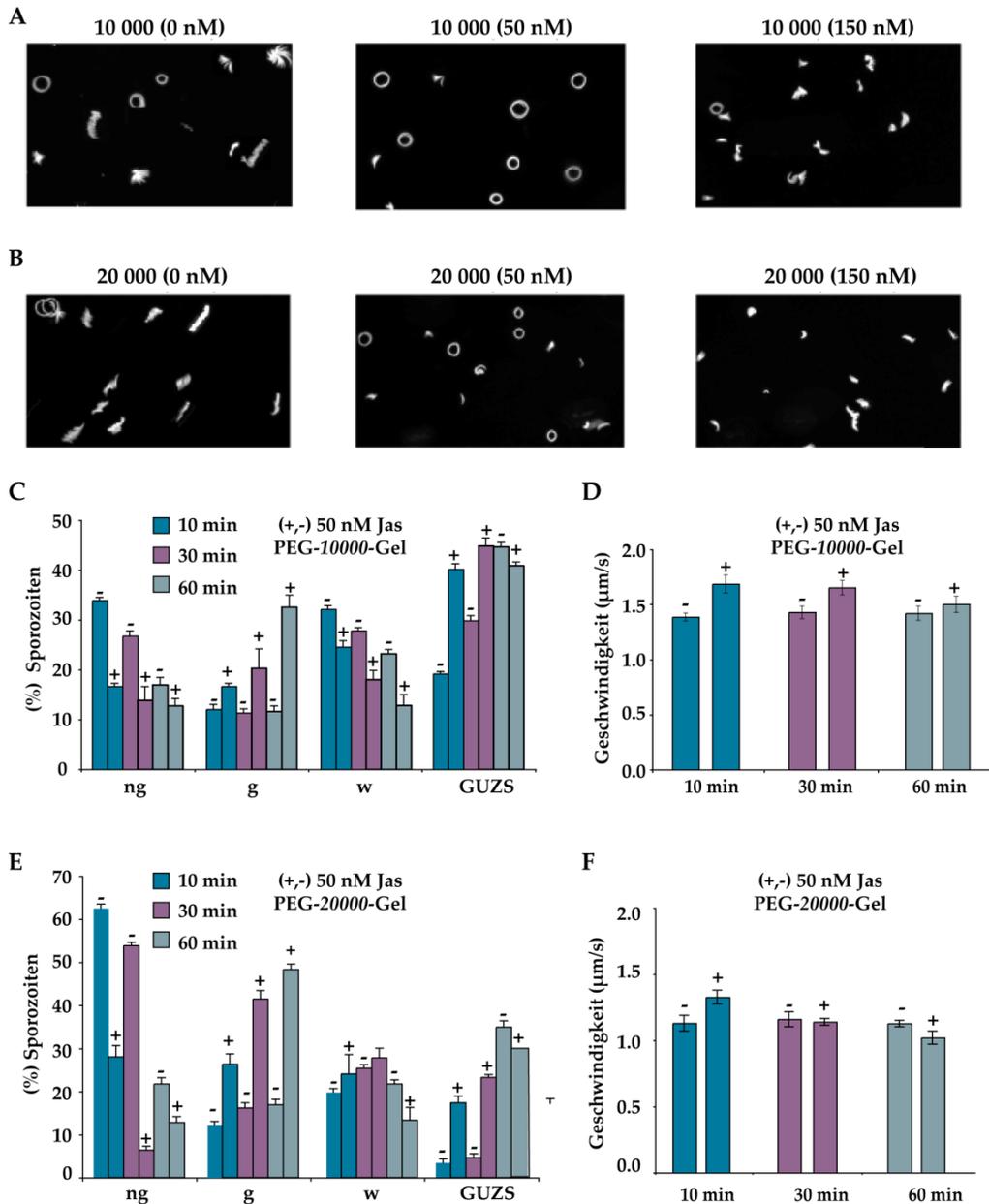


Abbildung 72: Jasplakinolid (Jas) erhöht die Motilität der Sporozoiten auf weichen Substraten in Abhängigkeit der Wirkungsdauer. (A, B) Gesamtprojektion der Fluoreszenzaufnahmen von Sporozoiten auf PEG-10000-DA Hydrogelen (A) und PEG-20000-DA Hydrogelen (B). Links: Substrate ohne Zugabe von Jas (-), Aufnahmen mit 50 nM Jasplakinolid-Konzentration (Mitte) und mit 150 nM Jasplakinolid (rechts). C) Quantitative Auswertung der Sporozoitenbewegung bei 10, 30 und 60 Minuten auf PEG-10000-DA Hydrogelen ohne Jas (-) und mit Jas (+). ng: „nicht gebunden“, g: „gebunden“, w: „waver“, GUZS: gegen Uhrzeigersinn kreisend. D) Durchschnittsgeschwindigkeit der aktiv gleitenden Sporozoiten auf PEG-10000-Hydrogelen ohne (-) und mit (+) Jas (50 nM). E) Quantitative Auswertung der Sporozoitenbewegung bei 10, 30 und 60 Minuten auf PEG-20000-DA Hydrogelen ohne Jas (-) und mit Jas (+). F) Gemittelte Geschwindigkeit der aktiv gleitenden Sporozoiten auf PEG-20000-Hydrogelen ohne (-) und mit (+) Jas (50 nM). Der Maßstab entspricht 20 µm.

5.5.3 Analyse von *TLP(-)-Plasmodium* Sporozoiten auf elastischen Substratoberflächen

Neben Aktin spielen Oberflächenproteine der TRAP-Familie eine bedeutende Rolle für die Bewegungsfähigkeit der Sporozoiten^{216,248,249}. Aus diesem Grund war der Einsatz von Sporozoiten mit fehlendem Gen für das TRAP-ähnliche Protein (*TRAP-Like-Protein*) von Interesse. Es wurde bereits gezeigt, dass diese *TLP(-)*-Parasiten die Speicheldrüsen der Mücke in ähnlicher Anzahl befallen wie die Wildtyp-Parasiten. Die Infektion der Maus erfolgt jedoch verzögert^{197,250}. Detaillierte Analysen zeigten, dass ein Defekt der Adhäsionsbildung ein kontinuierliches Gleiten der *TLP(-)*-Sporozoiten beeinträchtigt, was möglicherweise zu einer langsameren Fortbewegung in der Haut führt²¹⁶. Um die bis dahin nicht fluoreszierenden Knockout-Parasiten [*TLP(-)*] besser mikroskopisch analysieren zu können, wurden Sporozoiten ohne TLP generiert, welche eine Hintergrundfluoreszenz durch zytoplasmatische GFP- (*green fluorescent protein*=grün fluoreszierendes Protein) Expression besitzen^{vi,257}. Die GFP-*TLP(-)*-Parasiten zeigten im Vergleich zu den *TLP(-)*-Sporozoiten dasselbe Bewegungsverhalten, sowie gleiche Prozentzahlen an gleitenden Parasiten und deren Geschwindigkeit (Abbildung 73). Somit konnten die gut zu beobachtenden GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten zur Untersuchung von *TLP(-)*-Parasiten eingesetzt werden.

^{vi} Die Generierung der GFP-*TLP(-)*-Sporozoite wurde durch Janina Hellmann aus der Gruppe von Dr. Friedrich Frischknecht durchgeführt.

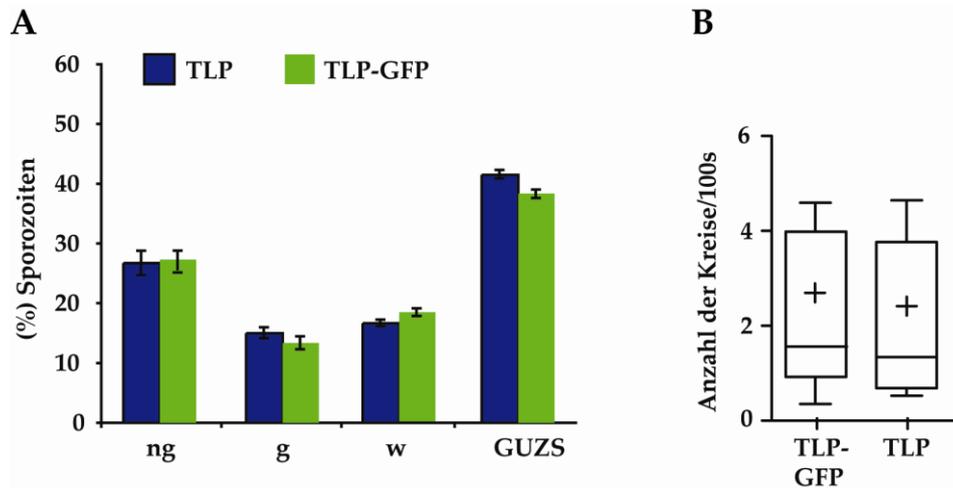


Abbildung 73: Vergleich der GFP-*TLP*(-)-Parasiten zu den *TLP*(-)-Sporozoiten^{vii}. Beide zeigen dasselbe Bewegungsverhalten in Bezug auf die Prozentzahl der gleitenden Parasiten (A) und Anzahl der durchgeführten Kreisbewegungen (Whisker - Plot, die Box entspricht dem Bereich, in welchem die mittleren 50 % der Daten liegen, - : Median, + : Mittelwert, Fehlerbalken entspricht 95 % der Werte) (B).

Die Untersuchung der GFP-*TLP*(-)-Sporozoiten auf PEG-700-DA-Hydrogelen ergab, dass sich diese im Vergleich zu Wildtyp-Sporozoiten weniger stabil bewegen (Abbildung 74). 40 % der *TLP*-Sporozoiten waren in der Lage auf PEG-700-DA-Hydrogelen zu kreisen, was im Vergleich zum Wildtyp eine nur um 10 % entsprechende Verringerung darstellt (Abbildung 74 A). Jedoch war der zurückgelegte Weg, bestimmt durch die Anzahl der durchgeführten Kreisbewegungen pro 100 sek, im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Abbildung 74 B). Die beobachteten *TLP*(-)-Sporozoiten auf den Hydrogelen (PEG-700-DA) besaßen offensichtlich ähnliche Adhäsionsprobleme, wie solche auf Glas²¹⁶. In folgenden Graphen werden die GFP-*TLP*(-)-Sporozoiten als *TLP* abgekürzt.

^{vii} Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Janina Hellman

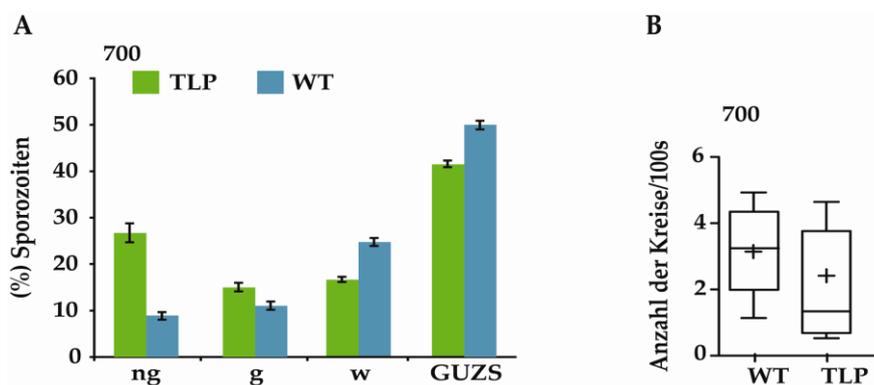


Abbildung 74: GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten auf PEG-700-DA-Hydrogelen im Vergleich zu Wildtyp-Sporozoiten. A) Im Vergleich zum Wildtyp lag nur eine Verringerung von ca. 10 % in Bezug auf die Prozentzahl der kreisenden Sporozoiten. B) Die Anzahl der Kreisbewegungen der GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten ist im Vergleich zu den Wildtyp-Sporozoiten deutlich reduziert (Whisker - Plot, die Box entspricht dem Bereich, in welchem die mittleren 50 % der Daten liegen, - : Median, + : Mittelwert, Fehlerbalken entspricht 95 % der Werte).

Auf weicheren Substraten bewegten sich die GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten wesentlich weniger effizient. So wurden auf PEG-10000-DA-Hydrogelen lediglich 7 % kreisende Parasiten beobachtet, während sich 20% des Wildtyps aktiv bewegten. Mit längerer Inkubationszeit der Sporozoiten auf den Substraten adhärten mehr Sporozoiten auf den weichen Substraten (PEG-10000-DA-Hydrogelen) und begannen zu gleiten. Insbesondere nach 60 Minuten zeigte sich eine starke Zunahme. 29 % der GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten, demnach eine Steigerung um ca. Vierfache, bewegten sich in diesem Fall. Die Anzahl der Wildtyp-Sporozoiten vergrößerte sich nach 60 Minuten auf 45 %, was ca. einer Verdopplung entspricht (Abbildung 75). Insgesamt schienen GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten auf PEG-10000-DA-Hydrogelen im selben Ausmaß zu gleiten, wie Wildtyp-Sporozoiten auf den noch weicheren PEG-20000-DA-Hydrogelen (Abbildung 76). Dies könnte möglicherweise auf erste Annäherungen der Eigenschaften von *TLP(-)*-Sporozoiten an WT-Sporozoiten unter bestimmten Bedingungen, wie auf Substraten welche in ihrer Elastizität der von Gewebe ähneln, hinweisen.

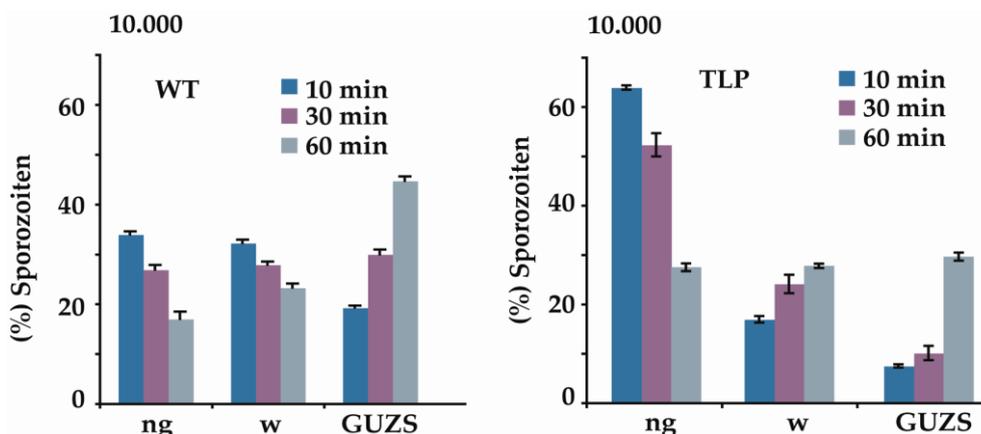


Abbildung 75: Vergleich von GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten und Wildtyp-Sporozoiten auf PEG-10000-DA Hydrogelen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Sporozoiten auf den Hydrogelen.

Auf PEG-20000-DA-Hydrogelen wurden dagegen nahezu keine gleitenden *TLP(-)*-Sporozoiten beobachtet. Selbst nach 60 Minuten konnten sich lediglich 10 % dieser Sporozoiten bewegen (Abbildung 76).

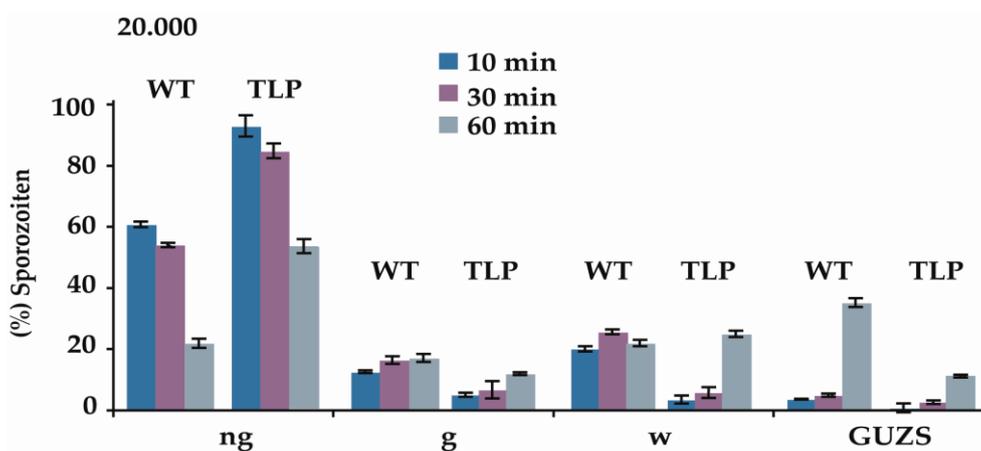


Abbildung 76: Vergleich von GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten und Wildtyp-Sporozoiten auf PEG-20000-DA Hydrogelen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Sporozoiten auf den Hydrogelen.

Die Knockout-Parasiten legten weniger Kreise pro 100 sek zurück, bevor sie sich ablösten. Dieses Ablösen erfolgte wesentlich öfter als beim WT-Sporozoiten, wodurch auch auf diesen Hydrogelen (insbesondere auf PEG-20000-DA-

Hydrogelen) ein Adhäsionsproblem der *TLP(-)*-Parasiten, wie bereits gezeigt bestätigt wurde (Abbildung 77). Auf PEG-35000-DA-Hydrogelen bewegten sich keine *TLP(-)*-Sporoziten mehr (Daten nicht abgebildet).

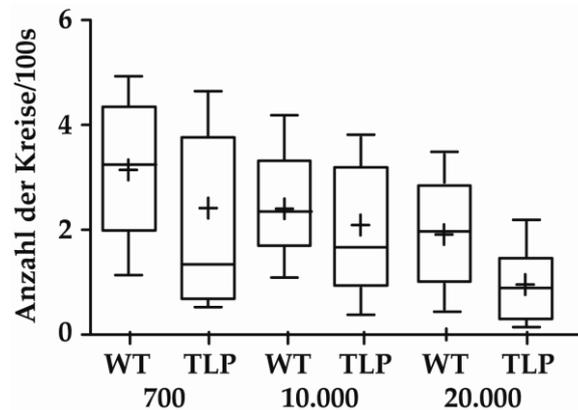


Abbildung 77: Vergleich der Anzahl der durchgeführten Kreise von Wildtyp-Sporoziten im Vergleich zu GFP-*TLP(-)*-Sporoziten auf unterschiedlich elastischen PEG-700-DA, PEG-10000-DA und PEG-20000-DA Hydrogelen (Whisker - Plot, die Box entspricht dem Bereich, in welchem die mittleren 50 % der Daten liegen, - : Median, + : Mittelwert, Fehlerbalken entspricht 95 % der Werte).

5.5.4 *TLP(-)-Plasmodium* Sporoziten auf elastischen Substratoberflächen unter Einfluss von Jasplakinolid

Da die Untersuchung von Wildtyp-*Plasmodium* Sporoziten auf elastischen Substratoberflächen unter Einfluss des Wirkstoffs Jasplakinolid, in Abhängigkeit von Konzentration und Wirkungsdauer, eine Steigerung des Bewegungsvermögens auf weichen Substraten ergab (Kap. 5.5.3), wurde im Weiteren untersucht, ob der Wirkstoff ebenfalls Einfluss auf Sporoziten hat, welche kein TLP exprimieren. Zu diesem Zweck wurden GFP-*TLP(-)*-Sporoziten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Jas auf Hydrogelen mit verschiedenen Elastizitäten untersucht und dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Auf PEG-700-DA-Hydrogelen zeigte sich, ähnlich wie bereits auf Glas vorgestellt²¹⁵, ein konzentrationsabhängiges, gehemmtes Bewegungsverhalten der Wildtyp-Parasiten

und der GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten (Abbildung 78). Interessanterweise wirkte sich jedoch der inhibitorische Effekt für eine bestimmte Konzentration von Jas weniger stark auf GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten aus als auf Wildtyp-Sporozoiten. Ca. 10 % der GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten kreisten noch nach 10 Minuten bei einer Jas-Konzentration von 1 μM , während bei den Wildtyp-Sporozoiten keine Bewegung mehr beobachtet wurde. Werden nur spätere Zeitpunkte untersucht, so bleibt dieser Effekt verborgen²¹⁶, da beispielsweise nach 30 Minuten beide Parasiten (*TLP(-)* und WT) keine aktive Bewegung mehr durchführen. Bei einer Konzentration von 50 nM Jas wurde bei den GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten nach 10 Minuten nahezu kein inhibitorischer Effekt beobachtet, während die Population der gleitenden Wildtyp-Sporozoiten um ca. 30% beeinträchtigt wurde (Abbildung 78).

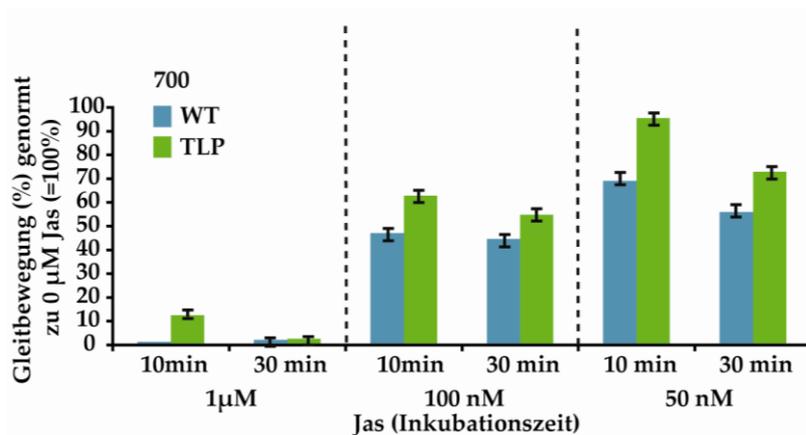


Abbildung 78: Vergleich von GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten und Wildtyp-Sporozoiten unter Einfluss von Jasplakinolid in Abhängigkeit der Zeit und der Wirkstoffkonzentration auf PEG-700-DA Hydrogelen.

Bedenkt man, dass *TLP(-)*-Sporozoiten im Vergleich zu Wildtyp-Sporozoiten in ihrem Fortbewegungsvermögen eingeschränkt sind²¹⁶, liegt nach Berücksichtigung der hier vorgestellten Ergebnisse unter Einfluss von Jasplakinolid die Vermutung nahe, dass die Zugabe von Jasplakinolid und somit die Bildung von zusätzlichen oder längeren Aktinfilamenten den Mangel an TLP temporär kompensieren kann. Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, wurden ebenfalls die Bewegung von Knockout-Sporozoiten auf PEG-10000-DA-Hydrogelen und PEG-20000-DA-

Hydrogelen beobachtet und analysiert (Abbildung 79). Diese Untersuchungen ergaben, dass sich GFP-*TLP(-)*-Sporoziten unter Einfluss von 50 nM Jas auf PEG-10000-DA-Hydrogelen, welche in ihrer Festigkeit der Elastizität von Gewebe ähneln, über eine Zeitspanne von 60 Minuten erstaunlicherweise ebenso gut kreisend bewegten wie Wildtyp-Sporoziten und somit offensichtlich den Phenotyp auf diesen Substraten unter Einfluss von Jas kompensierten (Abbildung 79 A). So bewirkte der Einfluss von Jas auf die WT-Sporoziten eine Steigerung der Motilität um ca. 100 %, während der Einfluss auf *TLP(-)*-Sporoziten sogar eine Zunahme um 400 % zur Folge hatte. Der Populationsanstieg der aktiv gleitenden, Jas behandelten GFP-*TLP(-)*-Sporoziten und der Wildtyp-Sporoziten verhielt sich auf stärker elastischen PEG-20000-DA-Hydrogelen ähnlich (Abbildung 79 C, D). Während sich auf diesen Substraten in Abwesenheit von Jas nur wenige Sporoziten aktiv bewegten (Abbildung 76), vermehrte sich die Anzahl während der ersten 30 Minuten unter Einwirkung von Jas etwa um das 5-fache (Abbildung 79 D). Lediglich nach 60 Minuten konnte kein Anstieg der Population kreisender *TLP(-)*-Sporoziten, durch die Wirkung von Jas, mehr beobachtet werden (Abbildung 79 D). Der Einfluss von Jas auf die Geschwindigkeiten der WT und *TLP(-)*-Parasiten verhielt sich entsprechend analog (Abbildung 79 E).

Ergebnisse und Diskussion

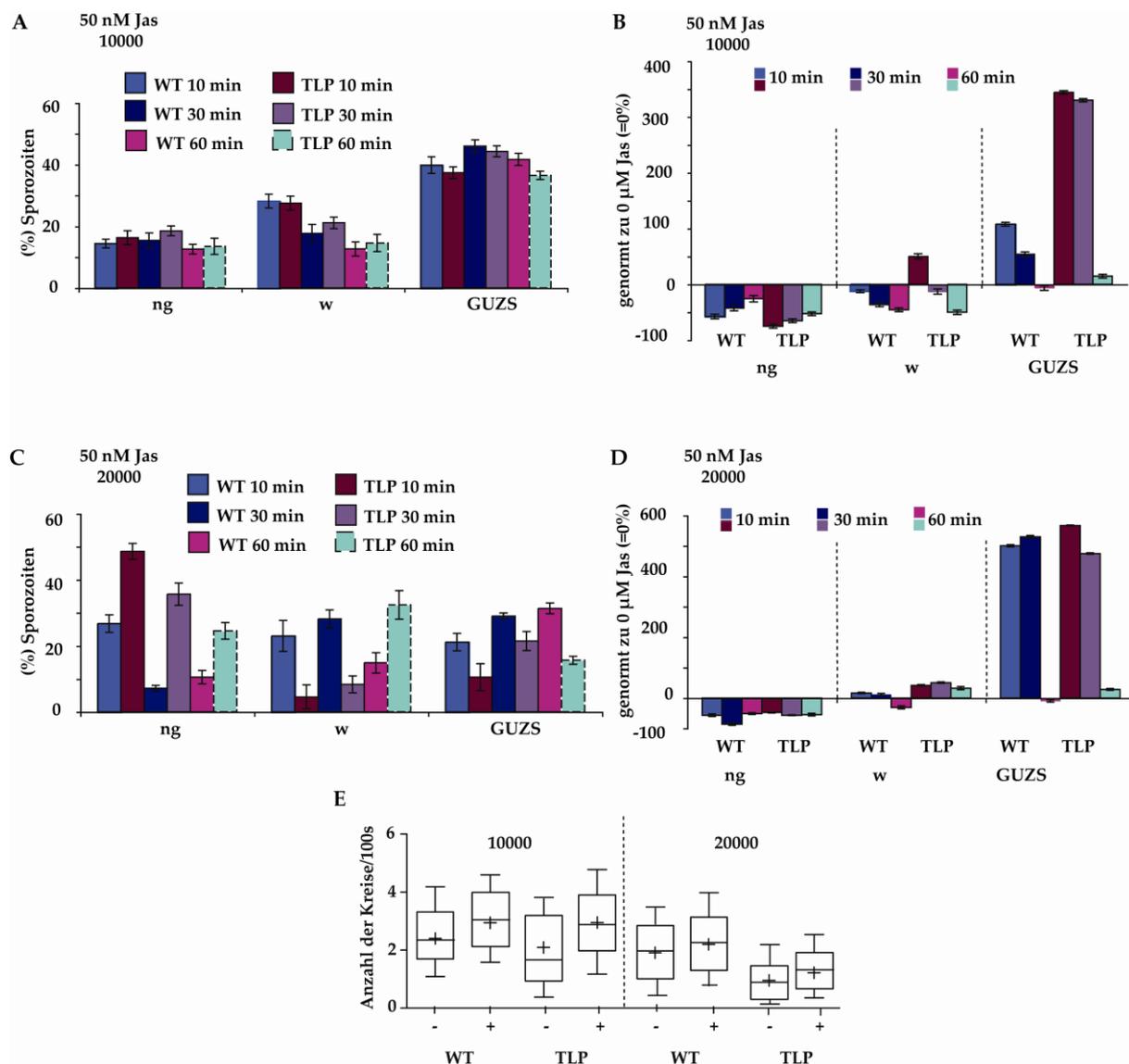


Abbildung 79: *TLP(-)*-Sporozoiten im Vergleich zu Wildtyp-Sporozoiten unter Einfluss von Jasplakinolid in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration und der Zeit, auf PEG-10000-DA (A, B) und PEG-20000-DA Hydrogelen (C, D). E) Veranschaulicht die jeweilige Anzahl der durchgeführten Kreise (Whisker - Plot, die Box entspricht dem Bereich, in welchem die mittleren 50 % der Daten liegen, - : Median, + : Mittelwert, Fehlerbalken entspricht 95 % der Werte).

Zusammengenommen zeigen diese Daten zum ersten Mal einen experimentellen Beweis für den Zusammenhang eines Proteins der TRAP-Familie und der Aktinpolymerisation, da eine gezielte Förderung der Aktinpolymerisation (durch Jas) dem Gleitdefekt der *TLP(-)*-Sporozoiten offensichtlich entgegenwirkt. Bisher beruhte der Nachweis für eine solche Verknüpfung auf indirekten Messungen, wie Messungen der biochemischen Wechselwirkung zwischen dem zytoplasmatischen

Ende der Proteine der TRAP-Familie mit dem glykolytischen Enzym Aldolase, welches wiederum mit Aktinfilamenten zu wechselwirken scheint²⁵¹, oder auf der Analyse von Parasiten, welche verschiedene mutierte Versionen der TRAP-Familien-Gene exprimieren, was zu einem Defekt in ihrer Motilität führt²⁴⁹. Bis zu den hier gezeigten Studien konnte bisher keiner dieser Defekte durch Manipulation der Aktindynamik behoben werden. Die hier erläuterten Ergebnisse geben keine Einblicke, wie TLP mit dem Aktinzytoskelett verknüpft ist, oder Signale übermittelt werden. Ebenso erklärt es noch nicht, wie die künstlich durch Jas erzielte Polymerisation von Aktin das Fehlen von TLP teilweise ausgleichen kann. Die Tatsache jedoch, dass die Verwendung von Jas den Mangel der TLP-Funktion auf einigen Substraten nahezu völlig kompensieren kann, zeigt erstmals deutlich die Verknüpfung zwischen dem Oberflächenprotein und dem dynamischen Zytoskelett auf. Es ist nicht bekannt, ob Jas die Bildung von mehr oder längeren Aktinfilamenten verursacht. Die meisten Bemühungen, die Aktinfilamente im Sporozoiten direkt zu visualisieren, sind bisher fehlgeschlagen^{252 - 254}. In dem verwandten Parasiten *Toxoplasma gondii* wurde demonstriert, dass die Verwendung von Jas die Parasitenbewegung erhöht und eine Desorganisation des Aktinzytoskeletts bewirkt. Die Länge und Anzahl der Filamente konnte jedoch auch hier nicht ermittelt werden²⁵⁵. Es könnte ebenfalls der Fall sein, dass eine erhöhte Aktinpolymerisation nicht allein das Adhäsionsverhalten beeinflusst, sondern auch die Sekretion von Proteinen. Es bedarf einigen genauen, weiterführenden Experimenten, um das Wechselspiel zwischen Adhäsionsproteinen des Parasiten mit dem Aktinzytoskelett direkt unter der Plasmamembran zu verstehen.

5.5.5 Passivierende Wirkung der Hydrogele auf *Plasmodium* Sporozoiten

Normalerweise wirken PEG-Hydrogele, welche bei einer Polymerisationszeit von 35 Minuten hergestellt wurden, proteinabweisend und passivierend gegenüber Zellsystemen^{245, 256}. Aus diesem Grund wurden sie zur Herstellung Gold-nanostrukturierter elastischer Systeme (siehe Teil II) etabliert. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass *Plasmodium* Sporozoiten auf diesen Substraten adhären und sich fortbewegen können (Abbildung 70, Abbildung 71). Um eine passivierende Wirkung der Hydrogelsysteme gegenüber den Sporozoiten zu gewährleisten, wurden im Weiteren unterschiedliche Herstellungsparameter variiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Variation der UV-Bestrahlungszeiten von 20 bis 60 Minuten und somit der Polymerisationszeiten eine bedeutende Rolle spielt (Abbildung 80). Die Beeinflussung des Kreuzvernetzungsgrades in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit führte zu den angestrebten Substraten und erlaubte die Herstellung von Substraten durch zwanzigminütige Bestrahlung auf denen weniger als 7 % der Parasiten adhäsions- beziehungsweise aktiv bewegungsfähig waren. Auf diesen Substraten versuchen die Sporozoiten Adhäsionskontakte herzustellen. Allerdings zucken die Parasiten zwar auf der Stelle („wobbelten“), können jedoch keinen festen Kontakt zum Substrat aufbauen (ng) und somit auch keine konstante Gleitbewegung durchführen. Insgesamt wurden die in Abbildung 80 A aufgeführten Bewegungsmuster beobachtet. Zwanzigminütige Bestrahlung führte zu einer hohen Prozentzahl von sogenannten „Wobblern“ und der geringsten Anzahl an kreisend gleitenden Parasiten (Abbildung 80 B). Diese Herstellungsweise wurde daher für sämtliche Experimente gewählt, bei denen eine passivierende Wirkung der Hydrogele ausschlaggebend war (Gold-strukturierte, oder Carboxy-funktionalisierte Hydrogele). 35 Minuten UV-Bestrahlung bedingte, wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, die höchste Population kreisender Sporozoiten. Bei 45- und 60-minütiger UV-Bestrahlung zeigte sich wiederum eine gute passivierende Wirkung, da der Großteil

der Sporozoiten keine Adhäsion ausführen konnte. Hier wurde nicht einmal ein "Wobbeln" beobachtet. Die Parasiten schwammen über die Substratoberfläche hinweg. Lediglich ein geringer Anteil der Sporozoiten bewegten sich kreisförmig (Abbildung 80). Da die Durchführung der Experimente auf diesen Substraten aufgrund von Strömungseinflüssen auf die schwimmenden Parasiten schwerer zu kontrollieren war, wurden zur experimentellen Analytik zwanzigminütig polymerisierte Substrate verwendet.

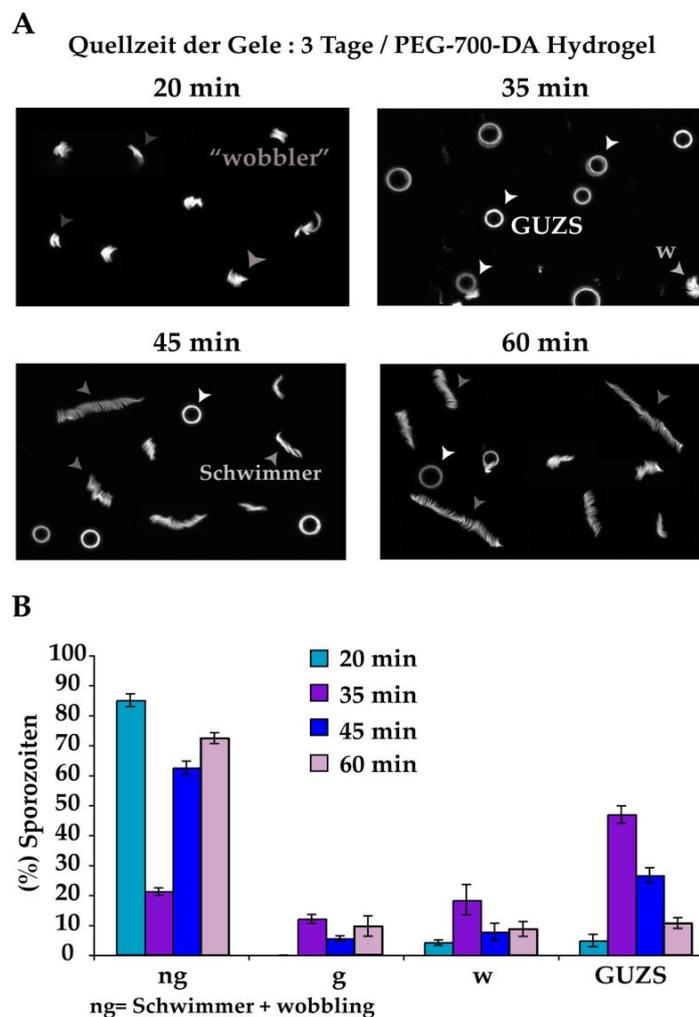


Abbildung 80: Bewegungsverhalten der *Plasmodium* Sporozoiten auf PEG-700-DA Hydrogelen, welche unterschiedlich lang polymerisiert wurden (UV-Bestrahlungszeit). A) Zeigt Aufnahmen der verschiedenen Bewegungs- und Adhäsionsverhalten von Parasiten auf Hydrogelen, die 20, 35, 45 und 60 Minuten einer UV-Bestrahlung ausgesetzt und somit kreuzvernetzt wurden. B) Prozentuale Angaben der ausgeführten Bewegungsformen.

Da die Sporozoiten in Medium präpariert wurden, welches BSA (3 %) enthielt, führte dies zu der Annahme, dass die Wechselwirkung von BSA mit den unterschiedlich bestrahlten und somit spezifisch kreuzvernetzten Gelen entscheidend für die Wechselwirkung der Oberflächen mit den Sporozoiten ist. Hierbei wird die Wechselwirkung von BSA mit der Hydrogeloberfläche vermutlich durch den Wassergehalt, die Anzahl der freien unvernetzten, aktiven Gruppen und die Maschengröße des vernetzten Gels beeinflusst. Diese Faktoren werden durch die Bestrahlungszeit (Polymerisationszeit) reguliert.

Das Wechselwirkungsverhalten der unterschiedlich polymerisierten Hydrogele mit BSA und die damit verbundene Auswirkung auf das Bewegungs- und Adhäsionsverhalten der Sporozoiten wurden im Folgenden untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Hydrogele direkt in BSA-Lösung inkubiert. Ebenso wurden Substrate angefertigt, welche nach Lagerung in 3 %iger BSA-Lösung im Anschluss gewaschen wurden. Die Zugabe von Sporozoiten in Medium ohne BSA zeigte das gleiche Verhalten der Parasiten wie beim Standardexperiment. Selbst nach Waschen der BSA inkubierten Hydrogele waren die Sporozoiten im Falle der 35- und 45-minütig bestrahlten Gele noch fähig zu kreisen. Die Prozentzahl der gleitenden Sporozoiten war hierbei jedoch im Vergleich zu den nicht gewaschenen Substraten signifikant reduziert (Abbildung 81). Dies lässt deutlich auf eine Wechselwirkung der Hydrogele mit BSA schließen. Diese Beobachtung, dass BSA auch auf proteinabweisenden Oberflächen adsorbiert, ist konsistent mit den in Teil I durchgeführten QCM-Messungen auf mPEG2000. Hier zeigte sich, dass keine direkte Bindung erfolgt und die Adsorption von BSA sich nach Waschen der Substrate verringerte, jedoch blieben noch 1-3 % BSA auf den Substratoberflächen haften²³⁰ (Teil I). Dieser Anteil reicht aus, um eine Gleitbewegung der Sporozoiten zu ermöglichen^{257,247}. Die Wechselwirkung der zwanzigminütig bestrahlten Hydrogele mit BSA schien nicht gegeben und somit wurde kein Gleitverhalten der Parasiten auf diesen Substraten beobachtet. Aus diesem Grund wurden sämtliche Experimente mit

Gold-nanostrukturierten oder Carboxy-funktionalisierten Hydrogelen mit Substraten durchgeführt, welche 20 Minuten polymerisiert und drei Tage zum Quellen in PBS gelagert wurden.

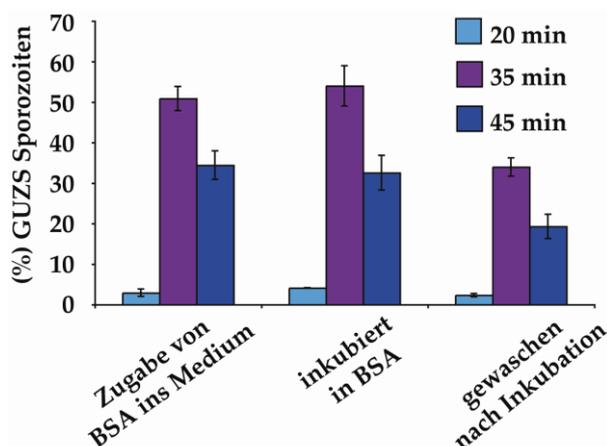


Abbildung 81: Zeigt die Anzahl der kreisenden Parasiten auf unterschiedlich lang (20 min, 35 min und 45 min) polymerisierten Hydrogelen (hier: PEG-700-DA), die BSA (*bovine serum albumine*) in unterschiedlicher Weise ausgesetzt wurden. Bei direkter Zugabe von BSA ins Medium, bei Inkubation der Hydrogele in BSA (Medium BSA frei), und bei Inkubation der Hydrogele in BSA und anschließendem Waschen der Gele in PBS (Medium BSA frei).

Weitere Kontrollexperimente wurden durch zusätzliche Verwendung von Gold-nanostrukturierten (Partikelabstände 70 nm) Hydrogelen durchgeführt (Teil II)²⁵⁶. Hierbei wurde lediglich auf goldstrukturierten Hydrogelen in Anwesenheit von BSA, welches essentiell für die Motilität von *Plasmodium* Sporozoiten ist^{247,258}, ein regelmäßiges Gleitverhalten beobachtet (Abbildung 82). 70 % der Sporozoiten kreisten mit einer gemittelten Geschwindigkeit von 1,85 $\mu\text{m}/\text{sek}$ (Abbildung 84).

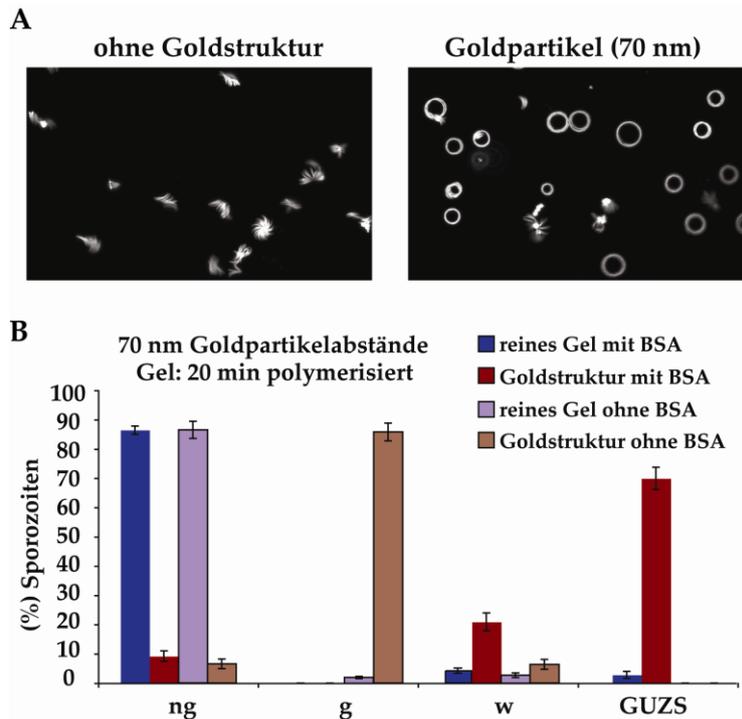


Abbildung 82: Kontrolleexperimente zum Nachweis der passivierenden Wirkung der Hydrogele (hier: PEG-700-DA) bei spezifischen Polymerisationszeiten. A) Aufnahmen der Bewegungsformen der Sporozoiten auf den jeweiligen Substraten ohne und mit Gold-Nanostrukturen (Partikelabstände 70 nm). B) Prozentzahlen der Bewegungsformen auf reinen und goldstrukturierten Hydrogelen, jeweils unter Zugabe von BSA und ohne Zugabe von BSA.

Abbildung 83 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der *Plasmodium* Sporozoiten auf Gold-nanostrukturierten Glassubstraten. Das Glas wurde mittels einer mPEG2000-Harnstoff-Beschichtung (Teil I) gegen eine unspezifische Anbindung passiviert. Die Aufnahmen mittels SE2-Detektor zeigen sehr gut die Form und Topographie der Sporozoiten (Abbildung 83 B). Gut erkennbar sind jeweils ein dickeres und ein dünneres Ende. Ebenfalls auffällig ist, dass die beiden Enden abgelöst von der Oberfläche erscheinen. Diese Tatsache kann möglicherweise durch die Probenpräparation verursacht sein, sie ist jedoch auch mit dem in Kap. 2.6.3 (Abbildung 36) beschriebenen Fortbewegungsverlauf der Sporozoiten konsistent. Beobachtungen mittels Inlens-Detektor zeigen durch kontrastreichere Abbildungen deutlich die Sporozoiten auf den nanostrukturierten Substratoberflächen. Dabei wurden erstmals Kontakte zu den Goldpartikeln

beobachten (Abbildung 83 C, rote Pfeile). Diese Beobachtungen könnten durch eine weiterführende, umfassende Untersuchung genauere Aufschlüsse über das Adhensionsverhalten bieten. Abbildung 83 D zeigt einen stachelartigen Fortsatz. Dieser wurde jedoch nur vereinzelt beobachtet. In der bisherigen Literatur wurde jedoch noch nicht auf einen solchen Fortsatz eingegangen.

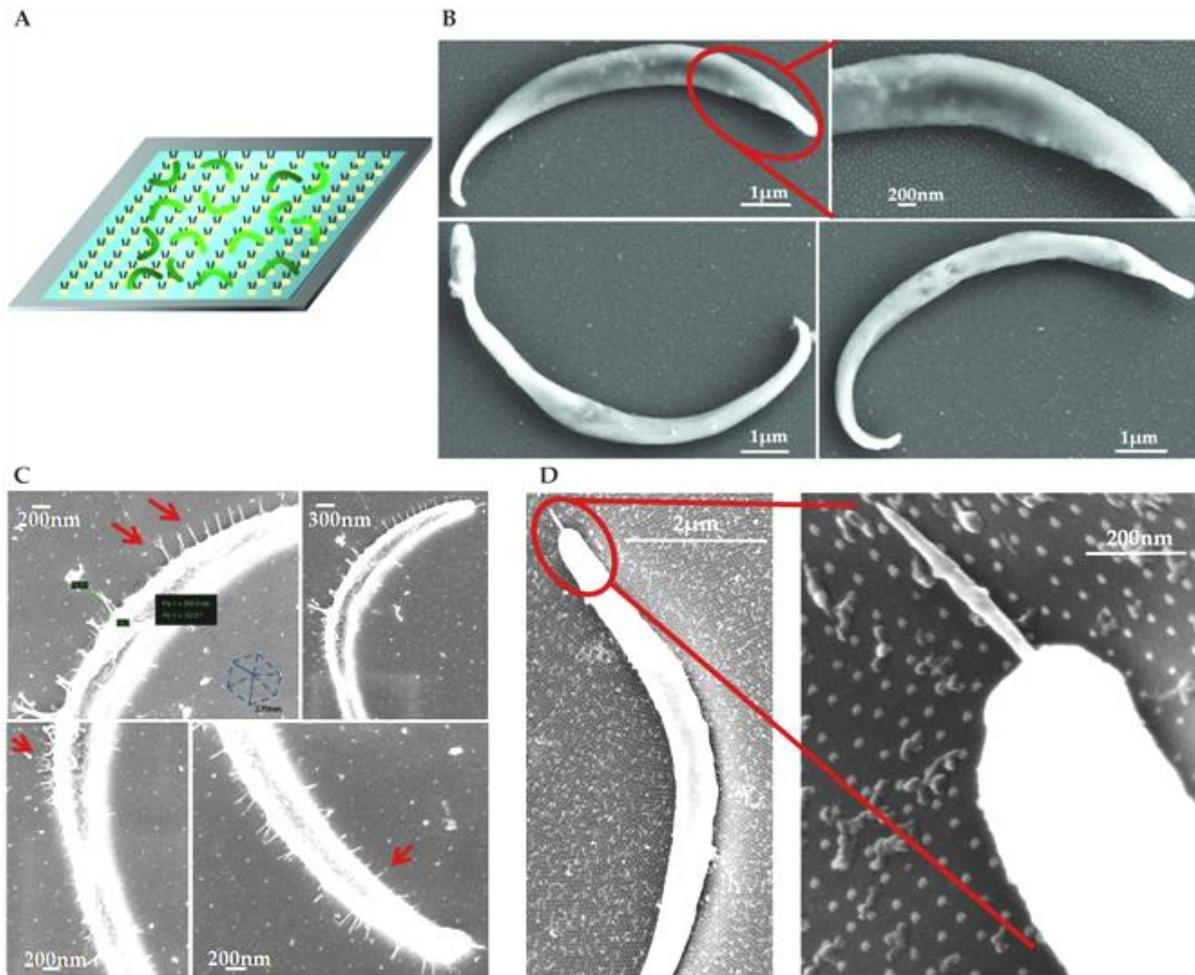


Abbildung 83: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Sporoziten auf Gold-Nanostrukturen. A) Schematische Darstellung des Systems. B) Aufnahmen mittels SE2 Detektor. C, D) Aufnahmen der Sporoziten mittels Inlens-Detektor. C) zeigt deutliche Kontakte zu den Goldpartikeln. D) zeigt einen stachelartigen Fortsatz.

5.5.5 Gleitverhalten von *Plasmodium* Sporozoiten in Abhängigkeit der Goldpartikelabstände (Linkerdichte)

Im Folgenden wurden passivierende Hydrogele (PEG-700-DA) mit unterschiedlichen Goldpartikelabständen generiert (Teil II, Abbildung 55). Die Untersuchung der *Plasmodium* Sporozoiten auf Substraten mit Nanostrukturen von 40-270 nm Partikelabständen zeigte unerwartete Einflüsse auf das Adhäsions- und Bewegungsverhalten (Abbildung 84).

Die Sporozoiten adhärten und bewegten sich am besten auf Substraten mit Partikelabständen der Goldstrukturen von 55 bis 100 nm (Abbildung 84 A). Ca. 40 % der Sporozoiten kreisten auf Glas- oder homogenen Goldsubstraten. Vergleichbar verhielten sich ebenfalls die Parasiten, welche auf goldstrukturierten Hydrogelsubstraten mit 40 nm Abständen beobachtet wurden. Die Anzahl der sich kreisend bewegenden Sporozoiten erhöhte sich auf 55 -100 nm Goldabständen auf 60 %. Beobachtungen zeigten erst bei 240 nm Partikelabständen eine Abnahme der Population auf 38 %, welche auf größeren Abständen von 270 nm noch weiter abnahm (25 %). Die Geschwindigkeitsverteilung der kreisenden Sporozoiten zeigte das gleiche Muster (Abbildung 84 B). Während sich die Sporozoiten auf Glas- und homogenen Goldsubstraten mit einer gemittelten Geschwindigkeit von $\sim 1,4 \mu\text{m/s}$ bewegten, erhöhte sich ihre Geschwindigkeit auf Goldpartikeln mit 55 nm Abständen auf $\sim 1,9 \mu\text{m/s}$. Schließlich verringerte sich die Durchschnittsgeschwindigkeit der Sporozoiten auf $\sim 1,4$ und $\sim 1,2 \mu\text{m/s}$ für Substrate mit 240 nm und 270 nm Partikelabständen. Entsprechend, zeigte die Anzahl der gebundenen und suchenden ("waver") Sporozoiten eine Abnahme auf Substraten mit 55-100 nm Partikelabständen. Dabei wurde eine Zunahme dieser Sporozoiten auf Abständen von 240 nm und 270 nm beobachtet (Abbildung 84 C).

Dies fördert die Annahme, dass ein mittlerer Bereich der Abstände (55-100 nm) von Adhäsionsrezeptoren der TRAP Familie²⁴⁹ optimale Bedingungen für eine maximale Beweglichkeit bietet (Abbildung 84 D).

Die hier durchgeführten Studien identifizieren die Sporozoiten somit als Zellen, welche spezifisch eine definierte Präferenz von Substraten mit einer bestimmten Elastizität sowie mit mittleren Abständen der Adhäsionsanker zeigen. Als eine sich sehr schnell bewegende Zelle muss der Parasit schnell Adhäsionskontakte bilden und lösen können, um seine maximale Geschwindigkeit zu erreichen²¹⁵. Die Bevorzugung der mittleren Abstände zwischen 55-100 nm spiegelt diese Notwendigkeit möglicherweise wieder. Abbildung 84 D veranschaulicht eine eventuelle Verlinkung bei optimaler Anordnung von Integrin-ähnlichen Proteinen.

Unter Berücksichtigung, dass der durchschnittliche *Plasmodium berghei* Sporozoit ca. 12 μm lang und nur bis zu 1 μm breit ist, lässt sich grob berechnen, dass sich der Sporozoit prinzipiell auf einer homogenen Gold- oder Glasoberfläche mit einer möglichen Fläche von $\sim 12\mu\text{m}^2$ anlagern kann. Auf einem nanostrukturierten Substrat mit Goldpartikelabständen von 55 nm und Partikeldurchmessern von $\sim 6-10$ nm (d.h. Fläche pro Goldpartikel $\sim 75\text{ nm}^2$) stehen dem Sporozoiten dagegen nur ca. 2800 Goldpartikel zur Verfügung, um eine Adhäsion auszubilden. Dies entspricht zusammengenommen einer Fläche von $\sim 0,2\ \mu\text{m}^2$. Mit nur einem Viertel dieser zur Verfügung stehenden Fläche bei ca. einer Verdopplung der Abstände zwischen den Adhäsionsankern (100 nm Partikelabstände), verhalten sich sowohl die Anzahl der kreisenden Sporozoiten als auch deren Durchschnittsgeschwindigkeit immer noch gleich. Auf Substraten mit Partikelabständen von 270 nm (entspricht ~ 100 Goldpartikeln und einer nutzbaren Fläche von ca. $0,08\ \mu\text{m}^2$) wurden dagegen weniger gleitende Parasiten mit geringeren Geschwindigkeiten beobachtet als auf homogenen Goldsubstraten (Abbildung 84 A, B).

Dies ermöglicht die Abschätzung der Anzahl an Rezeptoren, die möglicherweise die Triebkraft für eine schnelle Fortbewegung darstellen. Vergleicht man die Integrin-ähnlichen Proteine wie TRAP, TLP oder S6 mit Integrin, welches ca. einen Durchmesser von 8-12 nm besitzt²⁵⁹, lässt sich annehmen das nur ca. 1-2 einzelne Oberflächenmoleküle des Sporozoiten an einen 10 nm Goldpartikel binden

können²⁶⁰. So würden nur lediglich 100-200 Rezeptoren an der Verlinkung der Aktinfilamente mit der gesamten Oberfläche eines Substrates mit Partikelabständen von 270 nm teilnehmen. Unter der weiteren Annahme, dass der Sporozoit während einer schnellen Fortbewegung nur mit einem Teil an das Substrat gebunden ist²¹⁵ indiziert dies, dass lediglich einige Dutzend Verlinkungen ausreichend sind um den Sporozoiten auf eine maximale Geschwindigkeit zu bringen.

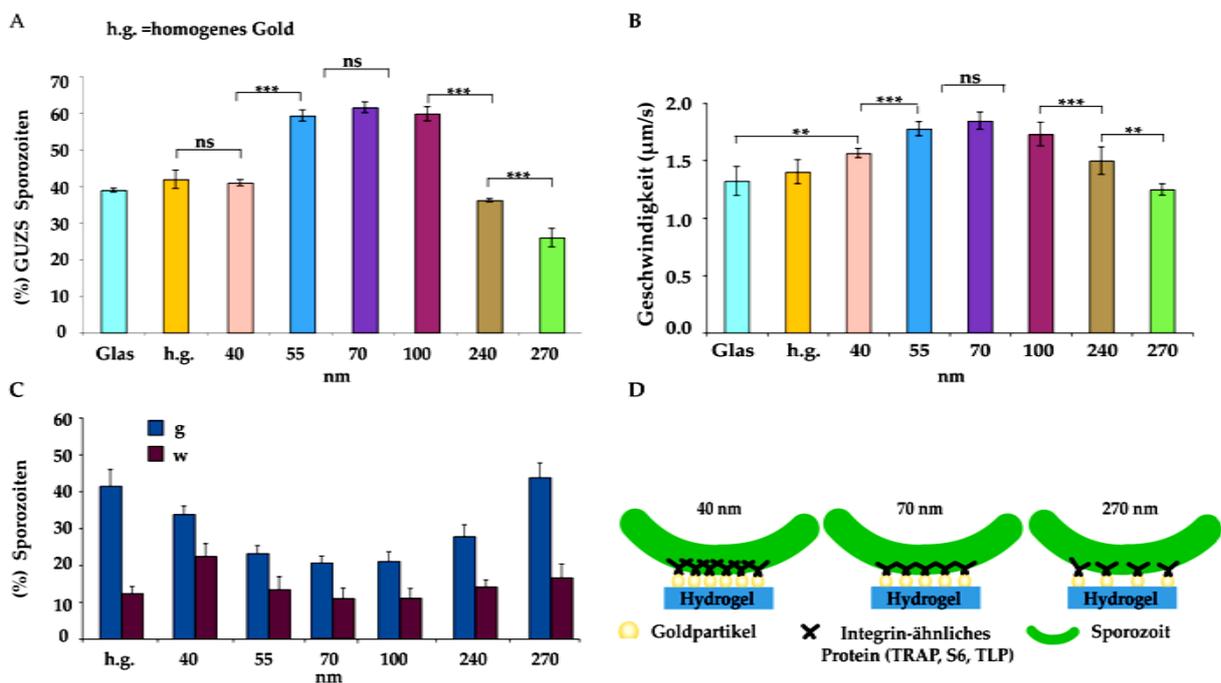


Abbildung 84: Bewegungsverhalten der Sporozoiten auf Gold-nanostrukturierten PEG-700-DA Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelabständen. A) Prozentuale Angabe der Anzahl kreisend gleitender Parasiten auf Abständen der Ankerpunkte von 40-270 nm und Vergleichssubstraten wie Glas und homogenes Gold. B) Geschwindigkeiten der kreisenden Parasiten auf den spezifischen Substraten. C) Anzahl der „gebundenen“ und der „suchenden“ („waver“) Sporozoiten auf unterschiedlich strukturierten Hydrogelen. D) Schematische Darstellung des möglichen Einflusses der Partikelabstände (Ankerpunkte) auf Integrin-ähnliche Proteine unter Spekulation eines eventuell „optimalen“ Abstands.

Diese Ergebnisse lassen Fragen über die Länge der Aktinfilamente aufkommen. Könnten kleine Filamente, welche individuell mit Adhäsionskontakten verlinkt sind, den Parasiten über Myosin-Motoren gezielt bewegen? Oder werden hierfür

Aktinfilamente benötigt, die mindestens zwei Adhäsionskontakte verbinden? Da die Parasiten auf Substratoberflächen mit Partikelabständen von 270 nm immer noch gleiten, würde dies voraussetzen, dass die Filamente länger wären als sie bisher *in vitro* beobachtet wurden^{261,262}.

Möglicherweise führen Aktinfilamente, welche nur an eine einzelne Adhäsionsstelle gebunden sind, zu einer geringeren Myosin-vermittelten Kräfteübertragung, da sich das Filament seitlich um den Adhäsionskontakt herum bewegen kann. Kürzlich wurden einige Sporozoitien beobachtet, die eine schnelle Vor- und Zurückbewegung durchführten. Man bezeichnet dies als "Stellengleiten" (*patch gliding*) über einen einzelnen Adhäsionskontakt²¹⁵. Es ist jedoch nicht bekannt, welche Größe eine solche Adhäsionsstelle besitzt. Ob sich der Parasit über einen einzelnen 5-8 nm großen Goldpartikel (Adhäsionsanker) bewegt, oder ob der Adhäsionskontakt einem Größenbereich entspricht, welcher der Breite des Parasiten ähnelt weiß man bisher nicht. Letzteres wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich der Parasit gewöhnlich in einer Ebene vor und zurück bewegt, was auf eine gewisse "Seitensteifigkeit" hindeutet.

5.5.6 *Plasmodium* Sporozoitien auf nanostrukturierten Substratoberflächen unter Einfluss von Jasplakinolid und Cytochalasin D

Beide Bewegungsformen, Stellengleiten (*patch gliding*) und gezielte Gleitbewegung, werden durch den Aktinfilament-abbauenden Wirkstoff Cytochalasin D (Cyto D) dosisabhängig gehemmt^{246,215}. Bei geringen Konzentrationen kommt es jedoch zu einer Steigerung der Adhäsionsrate („*adhesion turnover*“), während diese bei hohen Konzentrationen vermindert wird²¹⁵. Aus diesem Grund wird angenommen, dass Aktinfilamente eine Doppelrolle in Bezug auf die Bewegungsmöglichkeit der Sporozoitien einnehmen. Einerseits durch Vermittlung der Adhäsionsanordnung und Adhäsionsrate, und andererseits durch das Bereitstellen eines Rücktransportweges

für Adhäsionsrezeptoren²¹⁵. Um im Weiteren das Zwischenspiel zwischen Adhäsion und Motilität zu untersuchen, wurde eine Auswahl unterschiedlicher Konzentrationen von Cytochalasin D zu Sporozoiten auf unterschiedlich nanostrukturierten Hydrogelsubstraten gegeben (Abbildung 85).

Die Beobachtungen ergaben wie erwartet, dass sich die Sporozoiten bei zunehmender Konzentration von Cytochalasin D in geringerer Anzahl sowie auch langsamer bewegten (Abbildung 85 A, B). Hierbei zeigte sich, dass die Abnahme der Population von gleitenden Sporozoiten auf Substraten mit Partikelabständen von 55, 70 und 100 nm im Vergleich zu kleineren und größeren Abständen oder zur Glaskontrolle, bei identischer Konzentration von Cytochalasin D, geringer war (Abbildung 85 C). Verglichen mit unbehandelten Sporozoiten auf den entsprechend äquivalenten Substraten mit 40 nm Partikelabständen wurde eine Reduktion der gleitenden Parasiten nach Zugabe von 10 nM Cytochalasin D um 30 % beobachtet (70 % bewegten sich noch kreisförmig). Bei gleicher Konzentration des Wirkstoffs bewegten sich auf Substraten mit 55, 70 und 100 nm Partikelabständen jedoch immer noch 95 % der Parasiten kreisförmig auf der Substratoberfläche. Bei größeren Abständen nahm die Anzahl der sich kreisend bewegenden Sporozoiten erneut ab (Abbildung 85 A, B). Desweiteren kreisten Sporozoiten, ebenfalls unter Einfluss von Cytochalasin D, auf Substraten mit Abständen von 55, 70, 100 nm verglichen zu Substraten mit größeren oder kleineren Abständen mit höherer Geschwindigkeit (Abbildung 85 C). Dies weist darauf hin, dass der Verlust von filamentösem Aktin, verursacht durch Cytochalasin D, durch einen optimalen Abstand der Adhäsionskontakte kompensiert werden kann. Derzeit ist nicht bekannt, ob Cytochalasin D in den hier verwendeten Konzentrationen einen verkürzenden oder verringernden oder einen verkürzenden und verringernden Effekt auf die Aktinfilamente besitzt.

Die oben beschriebene Beobachtung führt zur Annahme, dass Aktinfilamente in einer Weise angeordnet sind, in der sie mit mindestens zwei Adhäsionsstellen

verankert sind. Dies würde bedeuten, dass Sporozoiten, welche auf Substraten mit großen Partikelabständen (240-270 nm) gleiten, anfälliger in Bezug auf eine Depolymerisation der Aktinfilamente zwischen diesen Adhäsionskontakten wären als Sporozoiten, welche sich auf Substraten mit kleinen Partikelabständen bewegen.

Warum gleiten Sporozoiten dann jedoch auf homogenen Substraten oder Substraten mit kleinen (40 nm) Partikelabständen verhältnismäßig weniger? Möglicherweise könnte durch zu enge Akkumulation von Aktin oder/und Oberflächenproteinen die Adhäsion gefördert oder die Deadhäsion vermindert werden.

Vereinfachend könnte man zusammenfassen, dass diese Substrate (homogenes Gold, 40 nm Abstände) aufgrund des hohen Oberflächenangebots eine starke Adhäsion ermöglichen, wodurch eine schnelle Fortbewegung der Parasiten gehemmt wird. Auf einem geringeren Oberflächenangebot dagegen können sich die Sporozoiten häufiger ablösen. Münter *et al.* zeigte mittels Reflektions-Interferenzkontrast-Mikroskopie bereits auf Glasoberflächen, dass in langsam gleitenden Parasiten insgesamt größere Adhäsionsbereiche zu beobachten sind²¹⁵.

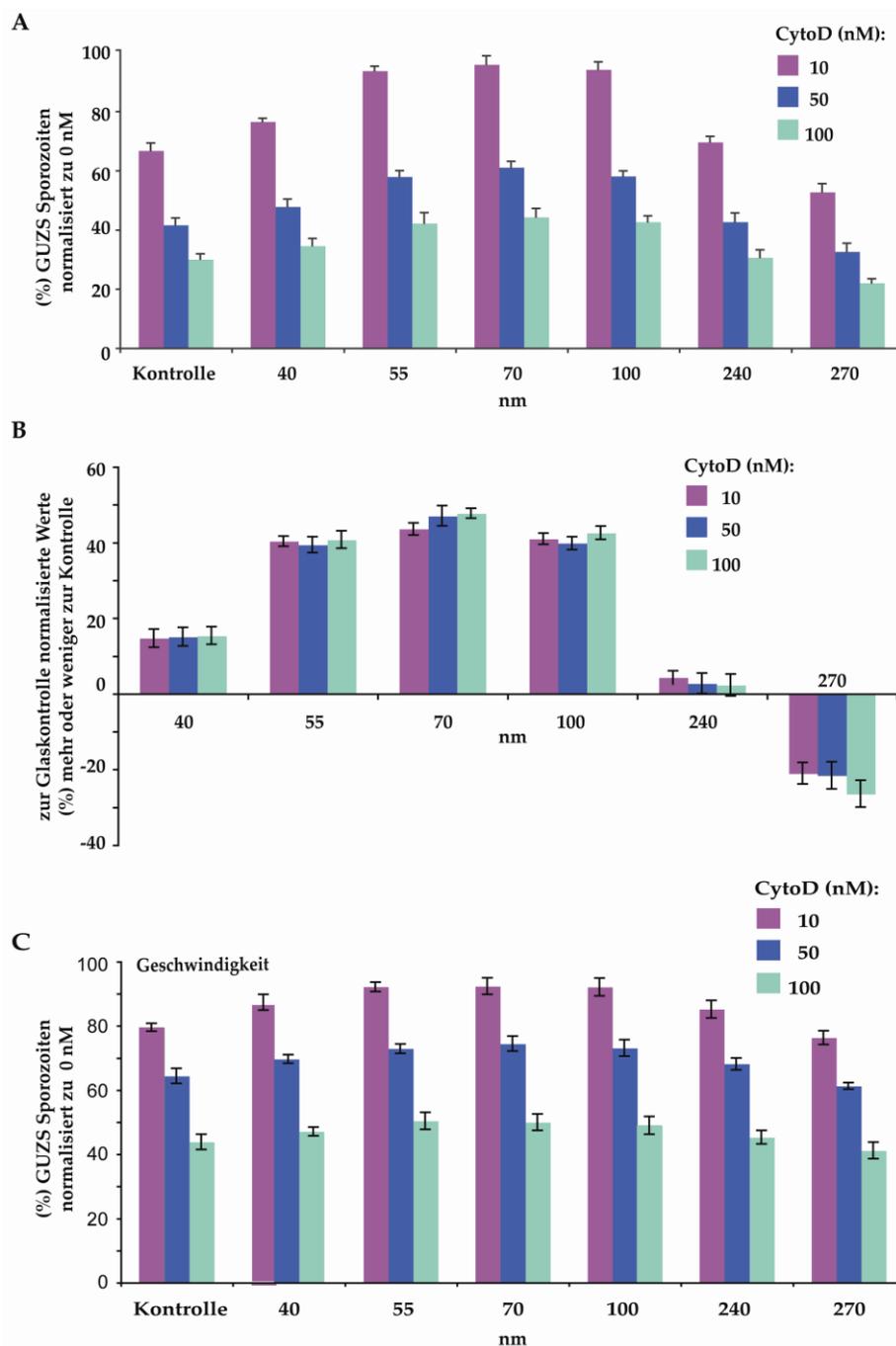


Abbildung 85: Untersuchung der Spermatozoen auf nanostrukturierten Hydrogelen (PEG-700-DA) mit unterschiedlichen Partikelabständen unter Einfluss des Aktinfilament-abbauenden Wirkstoffs Cytochalasin D (Cyto D). Es wurden ebenfalls Glaskontrollen zum Vergleich durchgeführt. A) Prozentuale Angabe der Anzahl der kreisend gleitenden Spermatozoen auf Partikelabständen von 40-270 nm unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Cyto D (10, 50, 100 nM). Die Angabe ist normalisiert zu 0 nM Cyto D. B) Veranschaulichung der Werte durch Normalisierung zur Glaskontrolle. C) Geschwindigkeit der kreisenden Spermatozoen auf nanostrukturierten Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelabständen unter Einfluss von 10, 50, 100 nM Cyto D. Die Angabe ist prozentual zur Geschwindigkeit der kreisenden Spermatozoen ohne Einfluss von Cyto D (0 nM) aufgeführt.

Neben der Wirkung von Cytochalasin D wurde ebenfalls der Effekt des Wirkstoffs Jasplakinolid, welche die Depolymerisation der Aktinfilamente hemmt, untersucht. Hierbei zeigten sich eine Schwächung der Adhäsion, sowie eine Verlangsamung der Sporozoiten auf den verwendeten PEG-700-DA-Hydrogelen und den Glaskontrollen. Bei Zugabe von Jasplakinolid (Jas) zu Sporozoiten auf nanostrukturierten PEG-700-DA-Hydrogelsubstraten wurde ein ähnliches Bewegungsverhalten wie im Falle von Cytochalasin D beobachtet. Auf Substraten mit 55 bis 100 nm Partikelabständen wirkte sich der Wirkstoffeffekt am wenigsten auf die Parasiten aus, während Sporozoiten auf Partikeln mit 40 und 270 nm Abständen in ihrer Anzahl und Geschwindigkeit stärker hemmend beeinflusst wurden (Abbildung 86).

Das Ausmaß in dem der Wirkstoff Jasplakinolid die Sporozoitenmotilität auf den nicht-optimalen Substraten einschränkte, war geringer als das bei Cytochalasin D. Auf den 40 nm Substraten könnte dies eine Verringerung der Adhäsion zur Substratoberfläche unter Einfluss von Jasplakinolid widerspiegeln.

Diese Daten unterstreichen die unterschiedlichen Effekte der beiden Wirkstoffe auf *Plasmodium* Sporozoiten, wodurch sie zu nützlichen "Werkzeugen" zur Analyse der Motilität von Malaria Parasiten werden. Die hier vorgestellten Daten repräsentieren vielversprechende Ansätze, um das faszinierende Zusammenspiel zwischen Adhäsionsbildung und Aktinpolymerisation zu verstehen, welche scheinbar synergistisch agieren, um den Sporozoiten ihre Motilität zu verleihen.

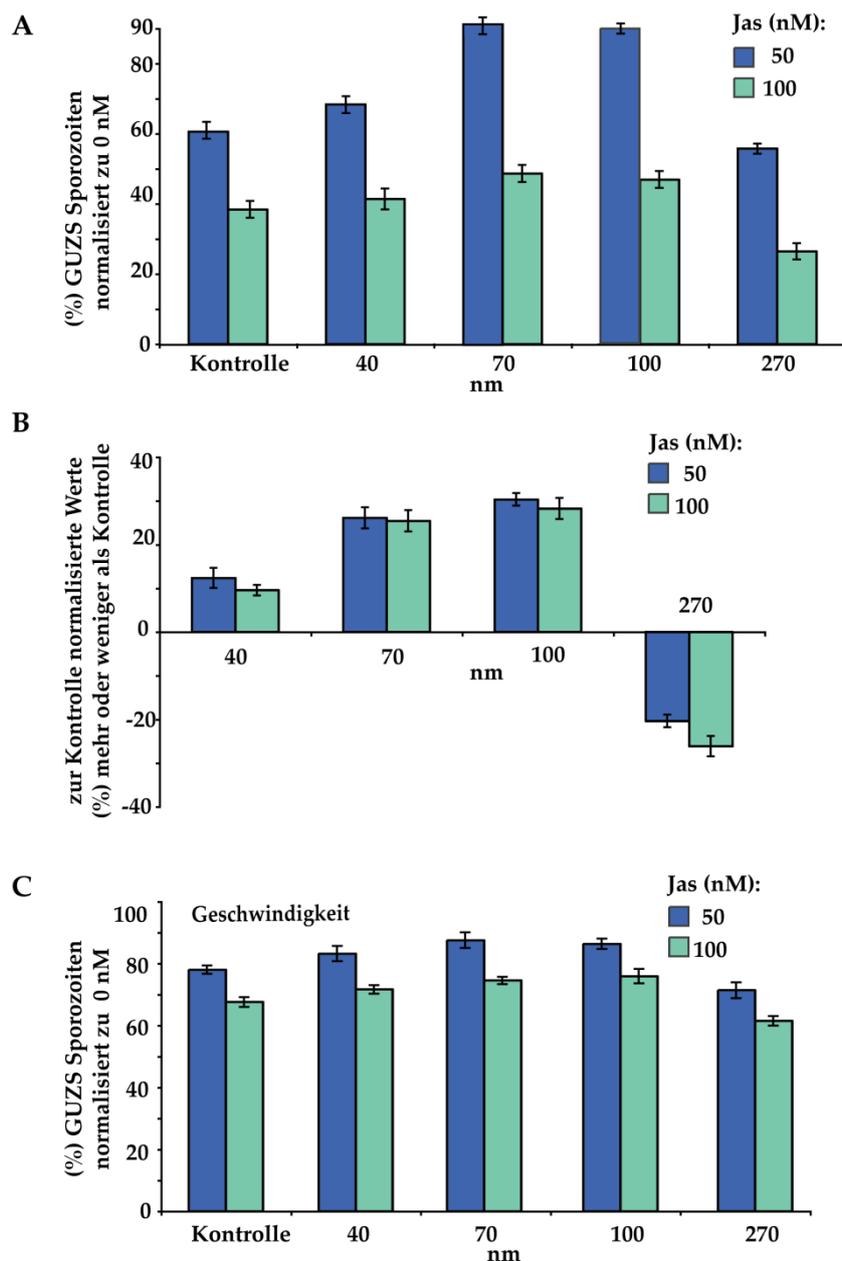


Abbildung 86: Untersuchung der Spermatozoen auf nanostrukturierten Hydrogelen (PEG-700-DA) mit unterschiedlichen Partikelabständen unter Einfluss des Aktin-depolymerisationshemmenden Wirkstoffs Jasplakinolid (Jas). Es wurden ebenfalls Glaskontrollen zum Vergleich durchgeführt. A) Prozentuale Angabe der Anzahl der kreisend gleitenden Spermatozoen auf Partikelabständen von 40-270 nm unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Jas (50, 100 nM). Die Angabe ist normalisiert zu 0 nM Jas. B) Veranschaulichung der Werte durch Normalisierung zur Glaskontrolle. C) Geschwindigkeit der kreisenden Spermatozoen auf nanostrukturierten Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelabständen unter Einfluss von 50, 100 nM Jas. Die Angabe ist prozentual zur Geschwindigkeit der kreisenden Spermatozoen ohne Einfluss von Jas (0 nM) aufgeführt.

Hiermit wurden erstmals Anzeichen geliefert, dass sich diese Zellen optimal auf Substraten mit mittleren (55-100 nm) Adhäsionsabständen fortbewegen. Des Weiteren wurde das synergistische Zusammenspiel zwischen Aktinfilamenten und Adhäsionsabständen während der Fortbewegung von Malaria Parasiten aufgezeigt.

5.5.7 *Plasmodium* Sporozoiten auf nanostrukturierten Hydrogelsubstraten mit unterschiedlichen Elastizitäten

Da in Kap. 5.5.5 und Kap. 5.5.6 gezeigt wurde, dass das Bewegungsverhalten von *Plasmodium* Sporozoiten auf Hydrogelen mit Gold-Nanostrukturen mit Partikelabständen zwischen 55 und 100 nm am effizientesten ist, wurden ebenfalls unterschiedlich elastische Hydrogelsubstrate mit Partikelabständen von 70 nm hergestellt²⁶³. In Bezug auf die allgemeine Motilität zeigten Aufnahmen der Sporozoiten und anschließende Analysen, dass die Sporozoiten auf nanostrukturierten Substraten generell dem Trend wie auf homogenen, nicht strukturierten Hydrogelen folgten (Abbildung 87). Ein Vergleich der Prozentzahlen der kreisenden Parasiten auf nanostrukturierten Substraten und auf homogenen Hydrogelen bestätigte zudem auch hier die zuvor beschriebenen Beobachtungen, dass sich die Sporozoiten besser auf nanostrukturierten Substraten mit mittleren Partikelabständen bewegen (Abbildung 71, Abbildung 87). So kreisten beispielsweise 45 % der Sporozoiten auf homogenen PEG-10000-DA-Hydrogelen (Polymerisationszeit: 35 Minuten). Auf dem entsprechenden PEG-10000-DA-Hydrogel mit Goldstrukturen (Partikelabstände: 70 nm, Polymerisationszeit: 20 Minuten) kreisten 57 % der Sporozoiten (Abbildung 71, Abbildung 87).

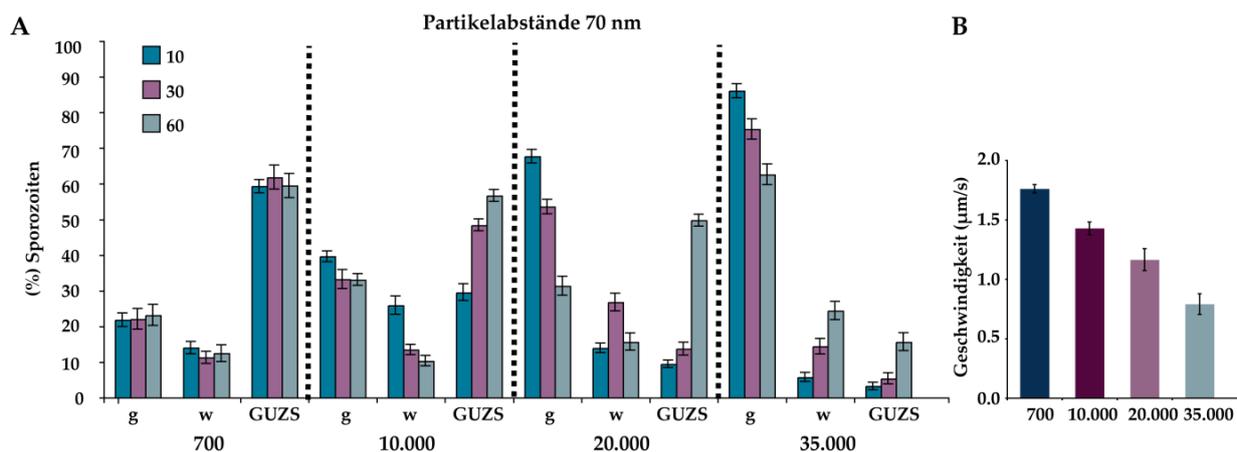


Abbildung 87: Sporozoitenbewegung auf unterschiedlichen PEG-DA-Gelen in Abhängigkeit der Zeit. Alle Hydrogele sind hier mit einer Gold-Nanostruktur versehen. Die Partikelabstände betragen 70 nm. A) Quantitative Auswertung der Sporozoitenbewegung auf unterschiedlich festen Hydrogelen mit Partikelabständen von 70 nm nach 10, 30 und 60 Minuten. GUZS: gegen den Uhrzeigesinn kreisende Sporozoiten (aufgrund invertierter Mikroskopieaufnahmen), w: „waver“ (einseitig gebunden, um die Kontaktstelle rotierende auf und ab Bewegung), g: „gebunden“ (nicht in Bewegung). B) Gemittelte Geschwindigkeit der sich aktiv bewegenden Sporozoiten auf den jeweiligen Hydrogelen mit Partikelabständen von 70 nm.

5.5.8 Gleitverhalten von *TLP(-)-Plasmodium* Sporozoiten in Abhängigkeit der Goldpartikel-Abstände (Linkerdichte)

Nachdem Experimente mit GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten auf unterschiedlich elastischen Hydrogelsubstraten (Kap. 5.5.3) interessante Einblicke brachten, wurden diese Sporozoiten mit fehlendem *TLP* ebenfalls auf nanostrukturierten Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelabständen und somit variabler Linkerdichte beobachtet und analysiert (Abbildung 88). Wie erwartet kreisten sie insgesamt im Vergleich zu den Wildtyp-Sporozoiten auf den unterschiedlichen Substraten weniger gut. Interessanterweise verhielt sich die Abnahme der kreisenden Sporozoiten im Verhältnis jedoch nicht einheitlich. Ein hoher Prozentsatz der GFP-*TLP(-)*-Sporozoiten bewegte sich auf Substraten mit Partikelabständen von 70 nm, während sich verhältnismäßig weniger Sporozoiten auf Oberflächen mit dichteren Partikeln oder weniger dichten Partikeln, wie 55 nm und 100 nm bewegten. Auf weiteren

getesteten Abständen (40 nm, 240 nm und 270 nm) wurde sogar eine noch schlechtere Gleitbewegung beobachtet (Abbildung 88 A, C, D). Ebenso verhielten sich die GFP-*TLP*(-)-Sporozoitin in Bezug auf ihre Geschwindigkeit. Auch hier zeigte sich deutlich eine Präferenz der Substrate mit Partikelabständen von 70 nm (Abbildung 88 B). Dagegen bewegten sich Wildtyp-Sporozoitin gleichermaßen gut, in Bezug auf ihre Anzahl und gemittelten Geschwindigkeit, auf Substraten mit Partikelabständen von 55, 70 und 100 nm (Abbildung 84, Kap. 5.5.5).

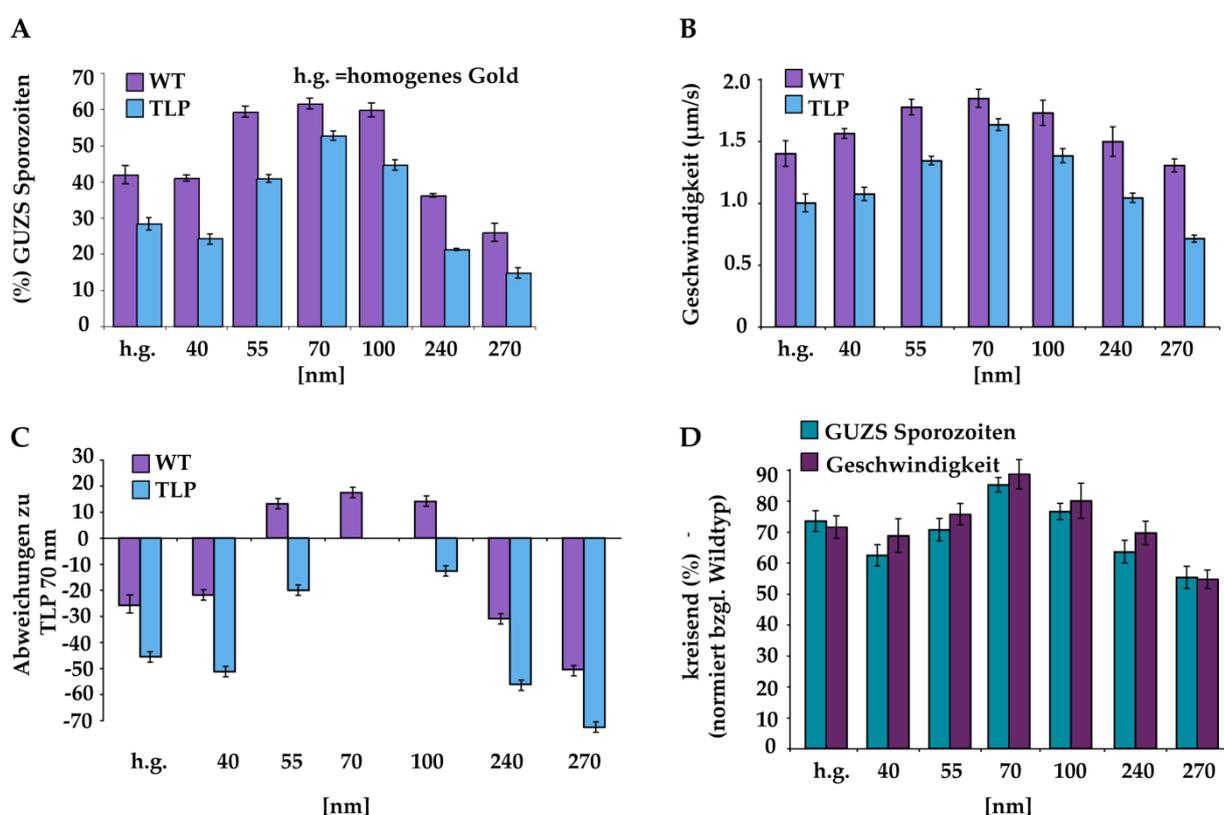


Abbildung 88: Wildtyp- und GFP-*TLP*(-)-Sporozoitin auf nanostrukturierten Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelabständen (variabler Linkerdichte). A) Quantitative Auswertung der Parasiten auf den unterschiedlich strukturierten Hydrogelen. B) Geschwindigkeit der Wildtyp- und GFP-*TLP*(-)-Sporozoitin auf nanostrukturierten Hydrogelen mit unterschiedlichen Partikelabständen. C) Veranschaulichung der quantitativen Werte durch Auftragen der Abweichungen zu *TLP*(-)-Sporozoitin auf Partikelabständen von 70 nm. D) Prozentuale Darstellung der Anzahl und Geschwindigkeiten der kreisenden *TLP*(-)-Sporozoitin normiert zum Wildtyp.

TLP scheint demnach nicht nur generell eine Rolle bei der Adhäsionsstabilisierung der Sporozoiten auf Substratoberflächen zu spielen, sondern hierbei auch noch in einer Art und Weise zu fungieren, welche abhängig von der Adhäsionsdichte ist.

5.5.9 *Plasmodium* Sporozoiten auf, mittels cRGDfk- und cRGEfk-funktionalisierten, Gold-nanostrukturierten Hydrogelsubstraten

Bisher zeigten zahlreiche experimentelle Beobachtungen in dieser Arbeit und auch in bekannter Literatur^{247,246,215} ein aktives Adhäsions- und Bewegungsvermögen der Sporozoiten *ex vivo* unter Zugabe von BSA. Vanderberg *et al.* formulierten, dass eine Gleitbewegung der *Plasmodium* Sporozoiten durch Wechselwirkung der Oberfläche des Sporozoiten mit Albumin initiiert wird. Diese Wechselwirkung führt demnach letztendlich zu einer Signalkaskade innerhalb der Sporozoiten und geht mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMPs, der Regulierung der Motilität der Sporozoiten über Ca²⁺ sowie der Freisetzung von Mikronemenproteinen einher. Die genaue Wirkweise wurde jedoch bisher nicht geklärt²⁵⁸. Wie in Abbildung 84 gezeigt, wurde im Verlauf dieser Arbeit eine bestimmte Abhängigkeit des Gleitverhaltens in Bezug auf die Ankerdichte bzw. Abstände der Ankerpunkte festgestellt. Im Folgenden wurden die Goldpartikel der unterschiedlich nanostrukturierten Hydrogelsubstrate mit dem bereits für Experimente eukaryotischer Zellsysteme, wie Fibroblasten, (Abbildung 30) etablierten cRGDfk funktionalisiert (Abbildung 11)³⁶. Die Beobachtung der Sporozoiten erfolgte in diesem Fall erstmals in völliger Abwesenheit von BSA. Die quantitative Auswertung der sich kreisend bewegenden Sporozoiten auf den Substraten mit kovalent an Gold gebundenem cRGDfk zeigte im Vergleich zu den Experimenten mit BSA sogar eine höhere Aktivität der Sporozoiten. Diese verbesserte Motilität spiegelte sich ebenfalls in der Geschwindigkeit der Sporozoiten auf den entsprechenden Substraten wieder. Hier wurden bei Partikelabständen von 70 nm Geschwindigkeiten von über 2 µm/s erzielt

(Abbildung 89 A, B). Die Bewegungsfähigkeit der Sporozoiten ist somit keinesfalls spezifisch von Albumin abhängig. Die verbesserte Motilität, könnte auf der kovalenten Bindung der cRGDfk-Sequenz beruhen, während das BSA nur in Lösung vorlag. Da die Motilität der Sporozoiten sich im Falle der cRGDfk-Funktionalisierung als hervorragend erwies, wurde der Aspekt der bei eukaryotischen Zellsystemen bekannte RGD-vermittelten Integrinbindung³⁶ interessant. Um zu untersuchen, ob das hier vorgestellte Zellsystem der *Plasmodium* Sporozoiten eventuell auch eine RGD-spezifische Integrin-ähnliche Bindung eingeht, wurde das Bewegungsverhalten der Sporozoiten ebenfalls auf nanostrukturierten Hydrogelen untersucht, bei denen die Goldpartikel mit cRGEfk funktionalisiert wurden, welches nicht Integrin-spezifisch bindet. Es zeigten sich hierbei im Vergleich zu den RGD-funktionalisierten Substraten, selbst bei längerer Beobachtungszeit von 30 Minuten, keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der kreisenden Sporozoiten sowie auf die Geschwindigkeit (Abbildung 89 C, D). Es liegt demnach keine RGD-spezifische Bindung der Sporozoiten vor.

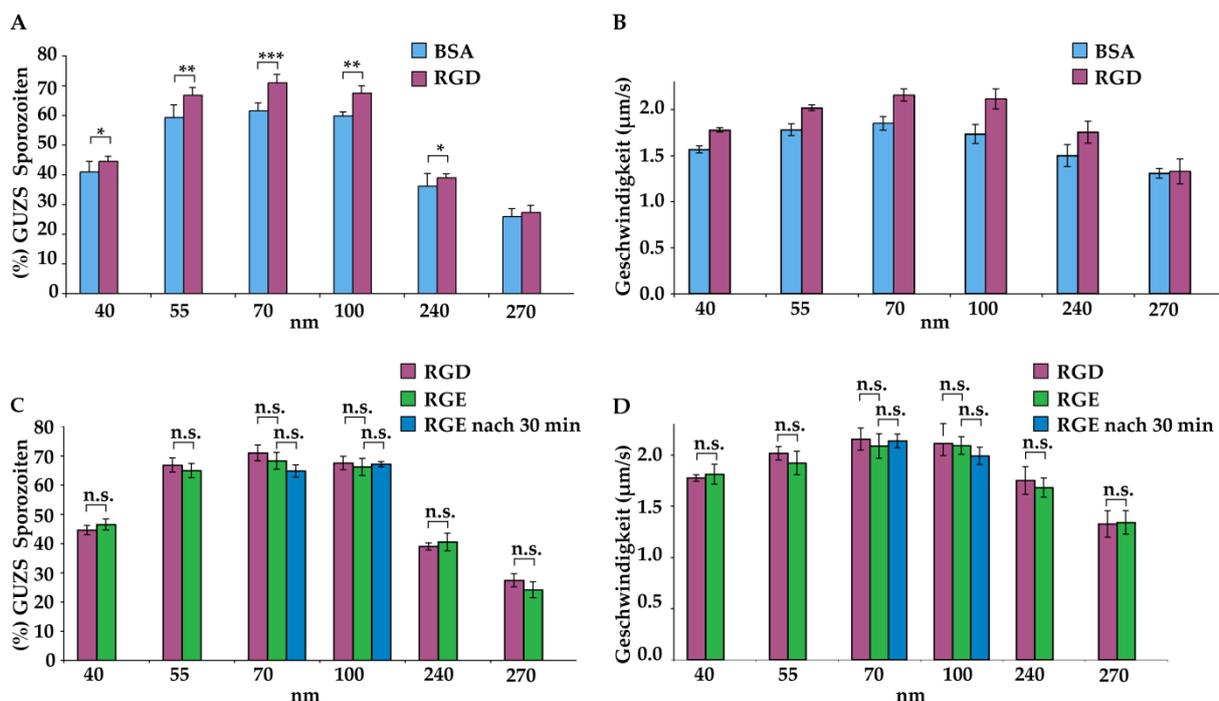


Abbildung 89: Bewegungsverhalten von *Plasmodium* Sporozoiten auf, mittels cRGDfk- und cRGEfk-funktionalisierten, Gold-nanostrukturierten Hydrogelsubstraten. A) Quantitative Auswertung der

kreisenden Sporozoiten auf cRGDfk-funktionalisierten Goldstrukturen im Vergleich zu Sporozoiten auf Gold-nanostrukturierten Hydrogelen unter Zusatz von BSA. B) Geschwindigkeiten der Sporozoiten auf den in A) beschriebenen Substraten. C) Quantitative Auswertung der kreisenden Sporozoiten auf cRGDfk- und cRGEfk-funktionalisierten Gold-nanostrukturierten Hydrogelen. D) Geschwindigkeiten der Sporozoiten auf den in C) beschriebenen Substraten.

5.5.10 *Plasmodium* Sporozoiten auf, mit unterschiedlichen Proteinen, funktionalisierten Hydrogelen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben sind *Plasmodium* Sporozoiten entgegen der bisherigen Annahme²⁵⁸ durchaus in der Lage, sich in Abwesenheit von Albumin unter Angebot von cRGDfk und cRGEfk kreisend auf Substratoberflächen fortzubewegen. Diese Beobachtung veranlasste die Untersuchung des Bewegungs- und Adhäsionsverhaltens der Parasiten auf unterschiedlichen Proteinen. Zu diesem Zweck wurde das in Kap. 5.3.1 (Teil II) vorgestellte, halbseitig Carboxy-funktionalisierte Hydrogelsystem genutzt. Die Proteine wurden über eine EDC-Aktivierung an die freiliegenden Carboxyfunktionen der Hydrogeloberfläche gekoppelt (Abbildung 90 A). Sämtliche Versuchsreihen wurden durch Kontrollen in Form von reinen Hydrogelen und proteinfreien Carboxy-funktionalisierten Hydrogelen begleitet. Hierbei war von weiterem Vorteil, dass durch die halbseitige Funktionalisierung auch immer eine interne Kontrolle zur Verfügung stand (Abbildung 90 A). Die Hydrogele wurden unter den etablierten Bedingungen von 20 Minuten UV-Bestrahlung und drei Tagen Quellzeit hergestellt, um eine Parasitenabweisende Wirkung des Hydrogels selbst zu gewährleisten (Abbildung 90 B). Alle Untersuchungen ergaben, dass die Sporozoiten nur auf proteinbeschichteten Hydrogeloberflächen fortbewegungsfähig waren. Unter dieser Voraussetzung wurde das Bewegungsverhalten der Sporozoiten analysiert. Hierbei zeigten die Parasiten, unabhängig von der Wahl des Proteins, auf sämtlichen Substratoberflächen die bekannte kreisförmige Fortbewegung. Dabei kreisten in allen Fällen mehr Parasiten als auf den Glaskontrollen unter Zugabe von BSA. Die höchste

Anzahl sowie Geschwindigkeit der kreisenden Sporozoiten wurde auf Hydrogeloberflächen beobachtet, welche mit Heparin funktionalisiert waren. Insgesamt zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen den Prozentzahlen und den Geschwindigkeiten (Abbildung 90 C, D).

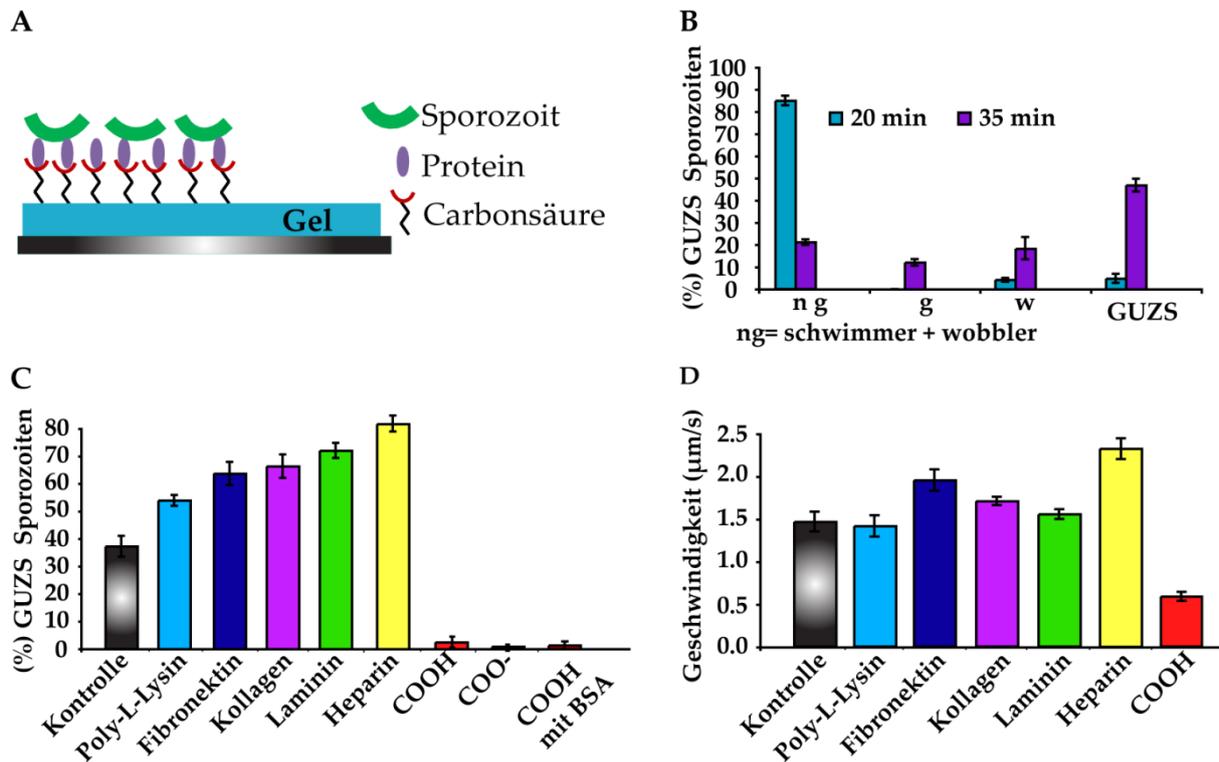


Abbildung 90: *Plasmodium* Sporozoiten auf unterschiedlichen Protein-funktionalisierten Hydrogeloberflächen. A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die halbseitig im Hydrogel vernetzten Carboxyfunktionen können beliebig mit unterschiedlichen Proteinen umgesetzt werden. B) UV-Bestrahlungszeiten der Hydrogelproduktion. Nach 20-minütiger UV-Bestrahlung wurde die stärkste abweisende Wirkung der Hydrogele gegenüber den Parasiten beobachtet. C) Quantitative Auswertung der kreisenden Sporozoiten auf den variierenden Proteinoberflächen. Die Kontrolle sind hier Glassubstrate unter Zugabe von BSA zum Vergleich mit den BSA-freien Protein-funktionalisierten Substraten. D) Auswertung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der kreisenden Parasiten.

5.6 *Plasmodium* Sporozoiten in nanostrukturierten Hydrogelröhren mit unterschiedlichem Durchmesser

Die Übertragung der *Plasmodium* Sporozoiten erfolgt durch den Stich der *Anopheles* Mücke nicht direkt in die Blutbahn, sondern zunächst in Gewebe²⁶⁴. Die vorherigen Kapitel befassten sich daher eingehend mit dem Bewegungsverhalten der Parasiten auf Substraten, die unterschiedliche Eigenschaften von Gewebe imitieren und erbrachten aufschlussreiche neue Einblicke. Betrachtet man den weiteren Verlauf des Lebenszyklus der *Plasmodium* Sporozoiten, kommen weitere Fragen auf. Vom Gewebe aus finden die Parasiten Blutgefäße, in welche sie schließlich eindringen und so in den Blutkreislauf gelangen. Erstaunlicherweise sind die Sporozoiten bei der Auswahl der Blutgefäße jedoch sehr wählerisch. Nicht jeder Kontakt mit einem Blutgefäß resultiert im Eindringen der Parasiten. Oftmals begeben sich die Parasiten nach längerem Aufenthalt in der Umgebung von Blutgefäßen wieder zurück ins Hautgewebe. Teilweise wird auch ein Eindringen in Lymphgefäße beobachtet, woraufhin sie in Lymphknoten zu finden sind²⁶⁴. Es stellt sich demnach die interessante Frage, wodurch die Parasiten bei der Gefäßauswahl beeinflusst werden. Zum Klärungsansatz dieser Aspekte wurde ein Modellsystem entwickelt, welches als Imitation von Blutgefäßen diente und ähnlich wie die zuvor beschriebenen Hydrogelsysteme durch mögliche Variationen von Parametern überzeugte. Hierfür wurden in HF-Säure unterschiedlich lang, zu spezifischen Durchmessern geätzte Glasfasern verwendet und mit Gold-Nanostrukturen versehen (Kap. 5.4). Eine Methode zur Untersuchung des Verhaltens der Parasiten bietet die Möglichkeit, die Bewegung der Sporozoiten um diese unterschiedlich stark gekrümmten Glasfasern, welche ergänzend mit bestimmten Funktionalisierungen versehen werden können, zu analysieren. Eine weitere Methode, welche in dieser Arbeit verfolgt wurde, basiert auf der anschließenden Übertragung der Goldpartikel auf das umgebende PEG-700-DA Hydrogel, wie in Kap. 4.1.10 beschrieben. Die Goldpartikel dienten somit als

Ankerpunkte für Adhäsionskontakte auf dem ansonsten passivierend wirkenden (Polymerisationszeit 1 h) Hydrogel.

Abbildung 91 zeigt die erfolgreiche Adhäsion von Sporozoiten in nanostrukturierten Hydrogelröhren und erste Eindrücke in Bezug auf die Bewegungsweise der Sporozoiten in unterschiedlich dicken Hydrogelröhren, welche variierend stark gekrümmte Wände besitzen. Im Falle der nanostrukturierten Hydrogelröhren mit einem Durchmesser von 50 μm kreisten die Parasiten nahezu auf der Stelle offensichtlich ohne die Krümmung wahrzunehmen (Abbildung 91 b). Dagegen schienen sie die stärkere Krümmung der Hydrogelröhren mit einem Durchmesser von 10 μm zu spüren und begannen sich entsprechend im dreidimensionalen Raum an der Innenwand entlang zu bewegen und rundherum zu kreisen (Abbildung 91 c). Diese Experimente zeigten zwar nur erste Ansatzpunkte, verdeutlichten jedoch das Potential des Systems zur weiteren und detaillierteren Untersuchung der Sporozoiten.

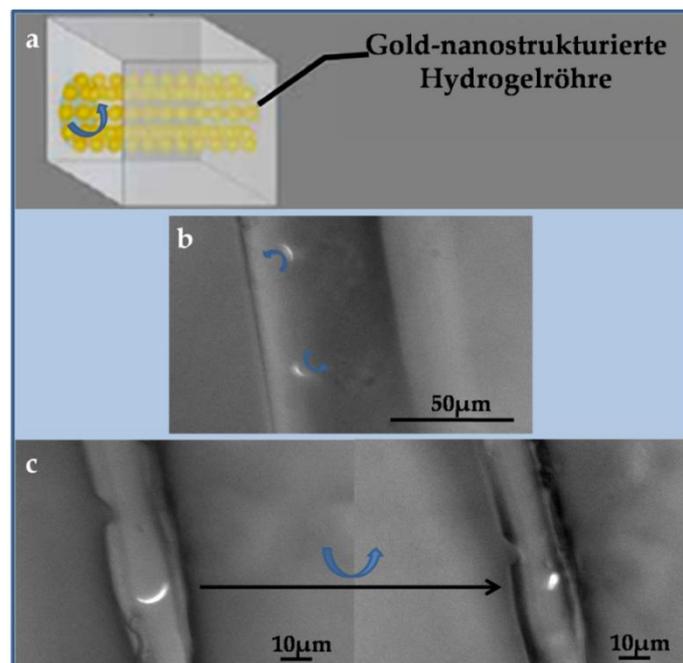


Abbildung 91: *Plasmodium* Sporozoiten in nanostrukturierten Hydrogelröhren mit unterschiedlichem Durchmesser und somit variierend starker Wandkrümmung. a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. b) Sporozoiten adhären an der Wand der nanostrukturierten Hydrogelröhre und kreisen auf der Stelle. Die Röhre besitzt einen Durchmesser von 50 μm . c) zeigt

den Parasiten in einer nanostrukturierten Hydrogelröhre mit deutlich stärkerer Wandkrümmung (Durchmesser 10 μm). Der Parasit passt sich an und führt die Kreisbewegung innerhalb der Röhre rundherum aus.

7. Fazit und Ausblick

7.1 Fazit Teil I: Charakterisierung proteinabweisender Eigenschaften kovalent gebundener PEG-Beschichtungen

In diesem Teil wurden unterschiedliche PEG-Beschichtungen auf SiO₂ mittels QCM untersucht ^{viii}. Somit konnten optimale PEG-Systeme, welche unspezifischen Proteinadsorptionen und Zelladhäsionen entgegenwirken, ermittelt und qualitativ charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass mPEG2000-Harnstoff Beschichtungen sowohl durch ihre einfache Herstellung als auch durch ihre hervorragende proteinabweisende Eigenschaft am besten geeignet sind. Durch Kombination der PEG-Beschichtung mit mizellarer Nanolithographie (Herstellung von Gold-Nanostrukturen) und spezifischer Biofunktionalisierung können so Modelloberflächen generiert werden, um Zelladhäsionen und Proteinimmobilisierung zu untersuchen. Hierbei spielt die Höhe der PEG-Beschichtungsfilme eine entscheidende Rolle um einerseits Proteinadsorption auf SiO₂-Substraten zu verhindern und andererseits die Gold-Nanopartikel für spezifische Biofunktionalisierung zugänglich zu halten.

7.2 Fazit Teil II: Entwicklung multivariabler Hydrogeloberflächen

Dieser Teil beschreibt die Entwicklung eines Systems mit variablen Oberflächeneigenschaften. Dieses System ermöglicht die Variation zahlreicher Parameter, wie Oberflächenelastizität, unterschiedliche Dichte der Kontaktpunkte und die Anwendung variabler Funktionalitäten. All diese Faktoren können

^{viii} In Zusammenarbeit mit Dr. Jacques Blümmel und Dr. Daniel Aydin.

spezifisch für bestimmte biologische Anwendungen angepasst werden. Aufgrund der hier verwendeten Transfer-Lithographie und des Kreuzpolymerisationsprozesses können diese Parameter unabhängig voneinander variiert werden. Zu diesem Zweck wurden Polyethylenglykol-Diacrylate (PEG-DA) 700, 10000, 20000, 35000 als dünne Schichten auf anorganische, transparente Substrate gebunden, wodurch exzellente Bedingungen zur Mikroskopie und Handhabung geschaffen wurden. Die Anordnung von Gold-Nanopartikeln in einer quasi-hexagonalen Struktur auf Glasoberflächen (hier Deckgläschen) basiert auf der Selbstanordnung von Diblockcopolymer-Mizellen. Diese Nanostrukturen können im Weiteren während eines Polymerisationsprozesses auf das Hydrogel übertragen werden. Aufgrund der proteinabweisenden Eigenschaft der Hydrogele, sind Zellen gezwungen auf vorgegebenen biofunktionalisierten (hier c(RGDfk)-Thiol) Goldpartikeln zu adhären. Durch aufstempeln einer Überstruktur können diese Nanostrukturen zusätzlich in definierten Bereichen in Form von Mikrostrukturen funktionalisiert werden. Das Herstellungsverfahren des Systems bietet des Weiteren die Möglichkeit separierte Bereiche, beispielsweise in Form kleiner Quadrate (z.B. 5 μm^2), mit verschiedenen Hydrogelen zu dekorieren. Diese können einzeln mit verschiedenen Nanostrukturen versehen werden, welche wiederum unterschiedlich funktionalisierbar sind.

Eine weitere Neuerung wurde hier in Form einer direkten Funktionalisierung der Hydrogele vorgestellt. Die kovalente Anbindung von Carboxygruppen wurde ebenfalls in definierten Bereichen der Hydrogeloberfläche und sogar in Mikrostrukturen ermöglicht. Die Carbonsäure-dekorierten Hydrogele konnten somit in nachfolgenden Schritten beliebig mit verschiedenen Proteinen umgesetzt werden. Da diese Systeme aufgrund der beschriebenen Eigenschaften die extrazelluläre Matrix außergewöhnlich gut imitieren, dienen sie somit hervorragend als Modellsysteme um biologische Fragestellungen, beispielsweise in Bezug auf Zelladhäsion in Abhängigkeit unterschiedlicher Substratlastizitäten, variierenden

Abständen zwischen Adhäsionsankerpunkten und dem Angebot verschiedener adhäsionsrelevanter Proteine, zu beantworten.

Die flachen Hydrogelsysteme wurden noch durch nanostrukturierte Hydrogelröhren ergänzt. Diese bereits vorgestellten^{245,228} Imitationen von Blutgefäßen wurden in einigen Punkten verbessert. So wurden sie beispielsweise mit unterschiedlichen Durchmessern hergestellt. Dabei lag der wichtigste Fortschritt hauptsächlich in der gleichmäßigen Nanostrukturierung unterschiedlich dünn geätzter Glasfasern mit einer außerordentlich guten Ordnung.

7.3 Fazit Teil III: Biologische Anwendung

Unter Verwendung der in Teil II entwickelten Systeme wurden *Plasmodium* Sporozoiten auf ihr Adhäsions- und Bewegungsverhalten hin untersucht. Dabei wurde erstmals experimentell gezeigt, dass sich diese Parasiten optimal auf Substraten mit mittleren Adhäsionsabständen (55-100 nm) fortbewegen. Außerdem wiesen die Experimente eindeutig darauf hin, dass die Adhäsionsbildung und die Polymerisation von Aktin synergistisch wirken, um die Motilität der Parasiten zu erzielen.

Die erstmalige Verwendung nanostrukturierter und elastischer Substrate war für die Erlangung eines tieferen Verständnisses von großer Wichtigkeit. Letztendlich zeigten die Beobachtungen, dass sich Sporozoiten in optimaler Weise auf härteren Hydrogelen (PEG-700-DA) bewegten, sich jedoch auf weicheren Hydrogelen (z.B. PEG-10000-DA) durch die Zugabe von Jasplakinolid zu einer effektiveren Fortbewegung stimulieren ließen. Dies widerspricht der Vermutung, dass die Sporozoiten auf Veränderungen ihrer Umgebung, während ihrer beschwerlichen Reise vom Mitteldarm der *Anopheles* Mücke zur Leber eines Säugetiers, nicht oder nur sehr schwach reagieren. Der Einsatz von *TLP(-)*-Sporozoiten auf den spezifischen Substratoberflächen zeigte, dass diese Sporozoiten spezielle Abstände der

Goldpartikel von 70 nm bevorzugten und sich darauf am besten fortbewegten. Diese noch eindeutigeren Präferenz bestimmter Abstände gab Anlass zur Annahme, dass TLP nicht nur für die Adhäsionsstabilisierung von großer Bedeutung ist, sondern dabei in seiner Funktion auch stark von der Adhäsionsdichte abhängig ist. Untersuchungen der *TLP(-)*-Sporozoitien auf elastischen Substraten ergaben, dass sich *TLP(-)*-Sporozoitien unter Einfluss von 50 nM Jasplakinolid auf PEG-700-DA, oder auch PEG-10000-DA-Hydrogelen, welche in ihrer Festigkeit der Elastizität von Gewebe ähneln, über eine Zeitspanne von 60 Minuten ebenso gut kreisend bewegten wie Wildtyp-Sporozoitien. Dieses Verhalten konnte auch auf noch weicheren Hydrogelen (PEG-20000-DA) beobachtet werden. Die vorgestellten Ergebnisse unter Einfluss von Jasplakinolid legen die Vermutung nahe, dass die Zugabe von Jasplakinolid und somit die Bildung von zusätzlichen, oder längeren Aktinfilamenten den Mangel an TLP temporär kompensieren kann. Diese Tatsache zeigt somit erstmals experimentell eine Verknüpfung zwischen dem Oberflächenprotein und dem dynamischen Zytoskelett. Im Weiteren wurde gezeigt, dass sich Sporozoitien *ex vivo* unspezifisch auf unterschiedlichen Proteinen bewegen und dabei, entgegen der Aussage von Vanderberg *et al.*²⁵⁸, kein BSA benötigen. Es müssen eindeutig mehr Studien durchgeführt werden, um das faszinierende Zusammenspiel zwischen Adhäsionsbildung und der Wechselwirkung von Adhäsionsproteinen der Parasitenoberfläche mit dem Aktinskelett direkt unter der Plasmamembran zu verstehen. Durch diese Arbeit und die daraus resultierende, erstmalige Anwendung eines so hoch variablen Systems, welches die Bedingungen und Charakteristika einer extrazellulären Matrix hervorragend imitiert, wurden jedoch bereits neue Wege, neue Erkenntnisse und neue Ansatzpunkte dargelegt.

Im letzten Zuge der Untersuchungen standen die Verhaltensweisen der Parasiten in nanostrukturierten Hydrogelröhren mit unterschiedlichen Durchmessern. Hier zeigte sich in den ersten Experimenten, dass sich die Sporozoitien offensichtlich in ihrer Bewegungsrichtung bzw. ihrem kreisenden Fortbewegungsverhalten dem

Durchmesser der Röhren und somit der Stärke der Wandkrümmung anpassen. Diese Imitationen von Blutgefäßen könnten in weiteren Studien in optimaler Weise zur Beobachtung der Sporozoiten in künstlichen Modellsystemen dienen.

7.4 Ausblick

Um möglicherweise ausstülpende Kontakte der Sporozoiten zu den Goldpartikeln, wie sie sich in Kap. 5.5.5, Abbildung 83 andeuten, zu visualisieren, werden sich zukünftige Projekte mit weiteren rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der *Plasmodium* Sporozoiten auf nanostrukturierten Oberflächen befassen. Hierbei sollen die Parasiten, beziehungsweise deren Kontakte, auf unterschiedlichen Partikelabständen beobachtet und charakterisiert werden. Das Vorhandensein dieser Kontakte (Kap. 5.5.5, Abbildung 83) bietet sich zudem für Versuche der Visualisierung der Aktinfilamente in diesen Bereichen an.

Der Fokus zukünftiger Experimente wird sich auf die Untersuchung der *Plasmodium* Sporozoiten in den nanostrukturierten Hydrogelröhren richten, welche in Kap. 5.6 vorgestellt wurden. Dieses System bietet zahlreiche interessante Ansätze. So sollen genauere Studien der Parasiten in den nanostrukturierten Röhren mit unterschiedlichem Durchmesser durchgeführt werden und die Art der Fortbewegung präziser charakterisiert werden. Dabei kann zusätzlich der Blutstrom durch Anlegen einer wohldefinierte Flussrate imitiert werden. Mit diesem System lässt sich der Einfluss dieser zusätzlichen Kraft auf den Parasiten während des passiven Transports und der darauf folgenden aktiven Adhäsion untersuchen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Hydrogele (bspw. PEG-10000-DA) kann die Elastizität der Hydrogelröhren variiert werden und eventuell sogar ein Versuch des Parasiten des Durchdringens der Röhrenwand, ähnlich wie beim Durchdringen von Blutgefäßen, induziert werden. Diese Beobachtung ist besonders vielversprechend,

wenn die nanostrukturierten Hydrogelwände durch adhärente Endothelzellen bedeckt sind. Die dazu erforderliche Adhäsion von REF52wt-Zellen in den nanostrukturierten Röhren wurde bereits erfolgreich gezeigt^{228,245}. Eine anschließende Zugabe der Parasiten in die zellbedeckte Röhre stellt eine optimale Imitation der Situation der Sporozoiten in Blutgefäßen dar. Durch konfokale Mikroskopie kann das Adhäsions- und Bewegungsverhalten unter diesen Bedingungen genauer untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- ¹ C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Science*, **1997**, 276, 1425-1428.
- ² G. M. Cruise, D. S. Scharp, J. A. Hubbell, *Biomaterials*, **1998**, 19, 1287.
- ³ G. Mac Beath, S. L. Schrieber, *Science*, **2000**, 289 (8 Sept.), 1760-1763.
- ⁴ J. L. Tan, J. Tien, C.S. Chen, *Langmuir* **2002**, 18, 519-523.
- ⁵ M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.*, **2002**, 20 (4), 160-166.
- ⁶ P. Krsko, M. Libera, *Materials Today*, **2005**, 8, 36.
- ⁷ K. Salaita, Y. Wang, C. A. Mirkin, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 145.
- ⁸ K. Wadu-Mesthrige, S. Xu, N. A. Amro, G.-Y. Liu, *Langmuir*, **1999**, 15, 8580-8583.
- ⁹ G.-Y. Liu, S. Xu, Y. Qian, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 457-466.
- ¹⁰ K.-B. Lee, S.-J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, M. Mrksich, *Science*, **2002**, 295, 1702-1705.
- ¹¹ K.-B. Lee, J.-H. Lim, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 5588-5589.
- ¹² J. J. Demerest, C. D. Wilson, C. T. Reimann, R. A. Baragiola, R. Hull, S. O. Oscarsson, *Langmuir*, **1998**, 14, 6785-6788.
- ¹³ N. Peppas, F. L. Boca Raton, *CRC Press*, **1985**.
- ¹⁴ B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K. M. Yamada, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2001**, 2, 793.
- ¹⁵ V. Vogel, M. Sheetz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, 265-275.
- ¹⁶ S. R. Khetani, S. N. Bhatia, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2006**, 17, 524.
- ¹⁷ A. J. Engler, S. Sen., H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell*, **2006**, 126 (4), 677-689.

- ¹⁸ Y. Hong, P. Krsko, M. Libera, Langmuir, **2004**, *20*, 11123-11126.
- ¹⁹ M. P. Lutolf, J.A. Hubbell, *Natural Biotechnol.*, **2005**, *23*, 47-55.
- ²⁰ B. Geiger, J. P. Spatz, A. D. Bershadsky, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, *10* (1), 21-33.
- ²¹ D. E. Discher, P. Janmey, Y.-L. Wang, *Tissue, Science*, **2005**, *310*, 1139-1143.
- ²² A. Bershadsky, M. Kozlov, B. Geiger, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2006**, *18* (5), 472-481.
- ²³ A. Nicolas, S. A. Safran, *Biophys. J.*, **2006**, *91* (1), 61-73.
- ²⁴ U. S. Schwarz, T. Erdmann, I. B. Bischofs, *BioSystems*, **2006**, *83* (2-3), 225-232.
- ²⁵ V. C. Hirschfeld-Warneken, *Doktorarbeit*, Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg, **2009**.
- ²⁶ C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. Wang, *Biophysical journal*, **2000**, *79* (1), 144, 152, 27, 28, 64.
- ²⁷ B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2009**, *10* (1), 21, 33, 30.
- ²⁸ U. S. Schwarz, and I. B. Bischofs, *Medical Engineering and Physics*, **2005**, *27* (9), 763-772, 30.
- ²⁹ W. R. Gombotz, G. Wang, T. A. Horbett, A. S. Hoffman., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1991**, *25*, 1547-1562.
- ³⁰ K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 10714-10721.
- ³¹ S. J. Sofia, V. Premnath, E. W. Merrill, *Macromolecules*, **1998**, *31*, 5059-5070.
- ³² N. A. Alcantar., E. S. Aydil, J. N. Israelachvili., *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, *51*, 343-351.
- ³³ A. Revzin, R. G. Tompkins, M. Toner, *Langmuir*, **2003**, *19*, 9855-9862.
- ³⁴ G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells and L. G. Griffith, *J. Cell Sci*, **2000**, *113*, 1677-1686.
- ³⁵ K. Poole, K. Khairy, J. Friedrichs, C. Franz, D. A. Cisneros, J. Howard, and D. Mueller, *J Mol Biol*, **2005**, *349* (2), 380-386.

- ³⁶ M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, and J. P. Spatz, *Chem. phys. chem*, **2004**, 5 (3), 383–388.
- ³⁷ E. A. Cavalcanti-Adam, A. Micoulet, J. Blümmel, J. Auernheimer, H. Kessler, and J. P. Spatz, *Eur. J. Cell. Biol.*, **2006**, 85 (3-4):219–224.
- ³⁸ E. A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J. P. Spatz, *Biophys J*, **2007**, 92 (8), 2964–2974.
- ³⁹ J. Sun, S. V. Graeter, L. Yu, S. Duan, J. P. Spatz, J. Ding, *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 2569–2572.
- ⁴⁰ J. Robert, J.R. Pelham, Yu-Li Wang, *Cell Biology*, **1997**, 94, 13661–13665.
- ⁴¹ J. G. Alauzan, S. Young, R. D'Souza, L. Liu, M.A. Brook, *Biomaterials*, **2010**, in press.
- ⁴² A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin, D. Discher, *Biophys. J.*, **2004**, 86, 617.
- ⁴³ U. S. Schwarz, N. Q. Balaban, D. Riveline, A. Bershadsky, B. Geiger, S. A. Safran, *Biophys. J.* **2002**, 83, 1380.
- ⁴⁴ N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, B. Geiger, *Nat. Cell Biol.*, **2001**, 3, 466.
- ⁴⁵ N. S. Morrissette and L. D. Sibley, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2002**, 66 (1), 21–38.
- ⁴⁶ J. L. Jones, A. Lopez, M. Wilson, J. Schulkin, and R. Gibbs, *A review. Obstetrical & Gynecological Survey*, **2001**, 56 (5), 296.
- ⁴⁷ L. M. Weiss, *Expert Opinion on Phar-macotherapy*, **2002**, 3 (8), 1109–1115.
- ⁴⁸ J.V. Barth, G. Costantini and K. Kern, *Nature*, **2005**, 437, 671–679.
- ⁴⁹ T. Ito and S. Okazaki, *Nature a-z index*, **2000**, 406 (6799), 1027–1031.
- ⁵⁰ H. Morimoto, Y. Sasaki, K. Saitoh, Y. Watakabe and T. Kato, *Microelectronic engineering*, **1986**, 4 (3), 163–179.

- ⁵¹ Y. Wada and K. Uehara, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1974**, *13*, 2014–2018.
- ⁵² M. Hirner, Terminologie der Nanotechnologie, *Diplomarbeit*.
- ⁵³ H. J. Butt, „Die Physikalische Chemie der Grenzfläche“, *Skript zur Vorlesung*, Universität Mainz, **1998**.
- ⁵⁴ L. Nick, A. Kindermann., J. Fuhrmann, *Colloid Polym. Sci.*, **1994**, *272*, 367.
- ⁵⁵ O.W. Webster, *Science*, **1991**, *251* (4996), 887–893.
- ⁵⁶ L. Nick, A. Lippitz, W. Unger, A. Kindermann, J. Fuhrmann, *Langmuir*, **1995**, *11*, 1912.
- ⁵⁷ L. Leibler, *Macromolecules*, **1980**, *13*, 1980, 1602.
- ⁵⁸ M. W. Matsen and F. S. Bates, *Macromolecules*, **1996**, *29* (23), 7641.
- ⁵⁹ I. W. Hamley, K. A. Koppi, J. H. Rosedale, F. S. Bates, K. Almdal, K. Mortensen, *Macromolecules*, **1995**, *28*, 2570.
- ⁶⁰ C. Park, J. Yoon and E. L. Thomas, *Polymer*, **2003**, *44*, (22) 6725–6760, 34.
- ⁶¹ M. Moffitt, K. Khougaz, and A. Eisenberg, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, *29* (2), 95–102.
- ⁶² K. A. Cogan, A. P. Gast, *Macromolecules*, **1990**, *23*, 745.
- ⁶³ Z. Gao, A. Eisenberg, *Macromolecules*, **1993**, *26*, 7353
- ⁶⁴ C. Hinderling, *Adv. Funct. Mater.*, **2006**, *16*, 1469–1475.
- ⁶⁵ G. Kästle, H.G. Boyen, F. Weigl, G. Lengl, T. Herzog, P. Ziemann, S. Riethmüller, O. Mayer, C. Hartmann, J.P. Spatz *et al.*, *Advanced Functional Materials*, **2003**, *13*, 11, 853 – 861.
- ⁶⁶ J. P. Spatz, S. Mossmer, C. Hartmann, M. Moller, T. Herzog, M. Krieger, H.G. Boyen, P. Ziemann, and B. Kabius, *Langmuir*, **2000**, *16* (2), 407–415.
- ⁶⁷ J. P. Spatz, S. Sheiko and M. Moeller, *Macromolecules*, **1996**, *29*, 3220–3226.
- ⁶⁸ K. Norrman, A. Ghanbari-Siahkali and N. B. Larsen, *Annual Reports Section C (Physical Chemistry)*, **2005**, *101*, 174–201.

- ⁶⁹ L. Landau and B. Levich, *Acta Physicochim. URSS*, **1942**, *17*, 42–54.
- ⁷⁰ A. S. Dimitrov and K. Nagayama, *Langmuir*, **1996**, *12*, 1303–1311.
- ⁷¹ N. Denkov, O. Velev, P. Kralchevski, I. Ivanov, H. Yoshimura, and K. Nagayama, *Langmuir*, **1992**, *8* (12), 3183–3190.
- ⁷² M. Arnold, *Doktorarbeit*, Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg, **2005**.
- ⁷³ P. G. De Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quéré, *Springer*, **2004**.
- ⁷⁴ A. A. Darhuber, S. M. Troian, J. M. Davis, S. M. Miller and S. Wagner, *Journal of Applied Physics*, **2000**, *88*, 5119.
- ⁷⁵ S. D. R. Wilson, *J. Eng. Math.*, **1982**, *16* (3), 209-221.
- ⁷⁶ B. I. Halperin and D. R. Nelson, *Physical Review Letters*, **1978**, *41* (2), 121–124.
- ⁷⁷ J. M. Kosterlitz and D. J. Thouless, *J. Phys. C*, **1972**, *5*, 0022–3719.
- ⁷⁸ C. A. Murray and D. G. Grier, *Annual Reviews in Physical Chemistry*, **1996**, *47* (1), 421–462.
- ⁷⁹ M. Mrksich, C. S. Chen, Y. Xia, L. E. Dike, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**, *93*, 10775-10778.
- ⁸⁰ A. Ulman, *Boston Academic Press*, **1991**.
- ⁸¹ A. Ulman, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 1533-1554.
- ⁸² C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 7164-7175.
- ⁸³ O. Dannenberger, M. Buck und M. Grunze, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103* (12), 2202-2213.
- ⁸⁴ C. Shen, M. Haryono, A. Grohmann, M. Buck, T. Weidner, N. Ballav, M. Zharnikov, *Langmuir*, **2008**, *24*, 12883.
- ⁸⁵ K. Furukawa, K. Ebata, H. Nakashima, Y. Kashimura, K. Torimitsu, *Macromolecules*, **2002**, *36*, 9.

- ⁸⁶ J. Noh, T. Murase, K. Nakajima, H. Lee, M. Hara, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, 7411.
- ⁸⁷ Y. Kang, D.-J. Won, S. R. Kim, K. Seo, Hwa-Sup Choi, G. Lee, Z. Noh, T. S. Lee, C. Lee, *Mater. Sci. Eng. A*, **2004**, *24*, 43.
- ⁸⁸ M. Haryono, F. W. Heinemann, K. Petukhov, K. Gieb, P. Müller, A. Grohmann, *Eur. J. Inorg. Chem*, **2009**, 2136.
- ⁸⁹ R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, D. L. Allara, *J. Am Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 2358.
- ⁹⁰ H. T. Rong, S. Frey, Y.J. Yang, M. Zharnikov, M. Buck, M. Wühn, C. Wöll, G. Helmchen, *Langmuir*, **2001**, *17*, 1582-1593.
- ⁹¹ N. Camillone, C.E.D. Chidsey, G.Y. Liu und G. Scoles, *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98* (4), 3503-3511.
- ⁹² G. E. Poirier, and M.J. Tarlov, *Langmuir*, **1994**, *10* (9), 2853-2856.
- ⁹³ X.D. Xiao, J. Hu, D.H. Charych und M. Salmeron, *Langmuir*, **1996**, *12* (2), 235-237.
- ⁹⁴ B. Arkles, Gelest, **2000**, *Gelest Inc.*, Tullytown, **2000**.
- ⁹⁵ D. A. Stenger, J. H. Georger, C. S. Dulcey, J. J. Hickman, A. S. Rudolph, T. B. Nielsen, S. M. McCort, and J. M. Calved, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 8435-8442.
- ⁹⁶ J. L. Wilbur, A. Kumar, E. Kim, G. M. Whitesides., *Advanced Materials*, **1994**, *6* (7/8), 600.
- ⁹⁷ A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.*, **1993**, *63*, 2002.
- ⁹⁸ D. J. Wilson, R. C. Pond, R. L. Williams, *Interface Science*, **2000**, *8*, 389.
- ⁹⁹ P.K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, N. Huang, *Materials Science and Engineering*, **2002**, *36*, 143.
- ¹⁰⁰ J. Huddleston, A. Veide, K. Koehler, J. Flanagan, S. O. Enfors, A. Lyddiatt, *Trends in Biotechnology*, **1991**, *9*, 381-388.
- ¹⁰¹ G. P. Lopez, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. Carroll, E. Peralta, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 5877.
- ¹⁰² J. D. Andrade, V. Hlady, *Adv. Polym. Sci.*, **1986**, *1*.

- ¹⁰³ S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes, *J. Colloid Interface Sci.*, **1991**, *142*, 149-158.
- ¹⁰⁴ J. H. Lee, H. Bang. Lee, J. D. Andrade, *Progress in Polymer Science*, **1995**, *20*, 1043-1079.
- ¹⁰⁵ B. Zdyrko, S. K. Varshney, I. Luzinov, *Langmuir*, **2004**, *20*, 6727-6735.
- ¹⁰⁶ A. Halperin, M. Tirrell, T. P. Lodge, *Adv. Polym. Sci.*, **1992**, *100*, 31-71.
- ¹⁰⁷ D. Schwendel, R. Dahint, S. Herrwerth, M. Schloerholz, W. Eck, M. Grunze, *Langmuir*, **2001**, *17*, 5717-5720.
- ¹⁰⁸ C. L. Feng, A. Embrechts, I. Bredebusch, A. Bouma, J. Schnekenburger, M. Garcia- Parajo, W. Domschke, G. J. Vancso, H. Schonherr, *Eur. Polym. J.*, **2007**, *43*, 2177-2190.
- ¹⁰⁹ A. S. Hoffman, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, *54*, 3-12.
- ¹¹⁰ T. R. Hoare and D. S. Kohane, *Polymer*, **2008**, *49*, 1993-2007.
- ¹¹¹ J. Kopecek and J. Yang, *Polymer International*, **2007**, *56*, 1078-1098.
- ¹¹² B. Baroli, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2007**, *96*, 2197-2223.
- ¹¹³ N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2000**, *50*, 27-46.
- ¹¹⁴ E. Timofeev, S. V. Kochetkova, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (16), 3142-3148.
- ¹¹⁵ J. E. Elliott, J. W. Anseth, C. N. Bowman, *Science*, **2001**, *56*, 3173-3184.
- ¹¹⁶ N. A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J. H. Ward, and J. Zhang, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2000**, *2*, 9-29.
- ¹¹⁷ K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Chem. Eng. Sci.*, **1994**, *47*, 2207-17.
- ¹¹⁸ A. B. Kinney, A.B. Scranton., ed. F.L. Buchholz, N. A. Peppas, ACS Symp. Ser. Washington DC, *Am. Chem. Soc.*, **1994**, *480*, 2-26.
- ¹¹⁹ J. Groll, T. Ameringer, J. P. Spatz, M. Moeller, *Langmuir*, **2005**, *21*, 1991-1999.

- ¹²⁰ F. M. Andreopoulos, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Biomaterials*, **1998**, *19*, 1343-1352.
- ¹²¹ S. J. Bryant, K. S. Anseth, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2002**, *59*, 63-72.
- ¹²² E. Asmussen, A. Peutzfeldt, *Eur. J. Oral. Sci.*, **2001**, *108*, 282-285.
- ¹²³ H. Vogel, *Gerthsen Physik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1995**.
- ¹²⁴ T. Dorfmüller, W.T. Hering, and K. Stierstadt, *Bergmann/Schaefer – Lehrbuch der Experimentalphysik, Bd.1: Mechanik, Relativität, Wärme*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1998**.
- ¹²⁵ H. Hertz, *J. Reine Angew. Mathematik*, **1882**, *92*, 156-171.
- ¹²⁶ A. L. Weisenhorn, M. Khorsandi, S. Kasas, V. Gotzos, H. J. Butt, *Nanotechnology*, **1993**, *4*, 106.
- ¹²⁷ C. Ploetz, E. I. Zycband, D. E. Birk, *J. Struct. Biol.*, **1991**, *106*, 73-81.
- ¹²⁸ E. Ruoslahti, B. Oerbrink, *Exp. Cell Res.*, **1996**, *227*, 1-11.
- ¹²⁹ H. M. Blau, D. Baltimore, *J. Cell Biol.*, **1991**, *112*, 781-783.
- ¹³⁰ *CELL BIOLOGY*, Sichuan University, Kapitell 4, Extracellular matrix, Cell junction and cell adhesion.
- ¹³¹ <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/bindegewebe/sfa/fasern/d-molekular.php>.
- ¹³² J. D. Watson, K. Roberts, M. Raff, J. Lewis, D. Brau, B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle 3. Aufl.*, VCH Weinheim, **1995**, 1165.
- ¹³³ D. R. Mosher (Hgb), Fibronectin, *Academic Press*, **1988**, New York.
- ¹³⁴ E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science*, **1987**, *238*, 491-497.
- ¹³⁵ M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 20233.
- ¹³⁶ R. Timpl *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 9933-9937.

- ¹³⁷ H. K. Kleinmann *et al.*, *Biochemistry*, **1982**, *21*, 6188-6193.
- ¹³⁸ <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/laminin.html>.
- ¹³⁹ J. E. Scott, *Biochemical Journal*, **1988**, *252*, 313-323.
- ¹⁴⁰ R. Erlinger, U. Schumacher, U. Welsch, *Anat. Ges.*, **1991**, *84*, 81-82, Gustav Fischer Verlag Jena.
- ¹⁴¹ B.S. Jacobson and D. Branton, *Science*, **1977**, *195*, 302.
- ¹⁴² D. Leifer *et al.*, *Science*, **1984**, *224*, 303.
- ¹⁴³ M. Cannella and R. Ross, *Neurology*, **1987**, *95*, 652.
- ¹⁴⁴ U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials*, **2003**, *24*, 4385-4415.
- ¹⁴⁵ H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, **2000**, New York, WH Freeman And Company, **2000**.
- ¹⁴⁶ M. V. Nermut, N. Green, P. Eason, S. S. Yamada, K. M. Yamada, *EMBO J.*, **1988**, *7*, 4093–4099.
- ¹⁴⁷ J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science*, **2001**, *294*, 339–345.
- ¹⁴⁸ M. Kim, C. V. Carman, T. A. Springer, *Science*, **2003**, *301*, 1720–1725.
- ¹⁴⁹ J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, T. A. Springer, *Cell*, **2002**, *110*, 599–611.
- ¹⁵⁰ R. Li, N. Mitra, H. Gratkowski, G. Vilaire, R. Litvinov, C. Nagasami, J. W. Weisel, J. D. Lear, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *Science*, **2003**, *300*, 795–798.
- ¹⁵¹ J. C. Adams, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 371–392.
- ¹⁵² N. J. Boudreau, P. L. Jones, *Biochem. J.*, **1999**, *339*, 481.
- ¹⁵³ D. E. Ingber, *PNAS*, **2003**, *100*, 1472–1474.

- ¹⁵⁴ Stefan Gräter, *Doktorarbeit*, Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg, **2006**.
- ¹⁵⁵ H. Shina, K. Zygourakis, M. C. Farach-Carson, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos, Attachment, *Biomaterials*, **2004**, 25, 895–906.
- ¹⁵⁶ C. Chung, R. Firtel, *J. Muscle Res. Cell Motil*, **2002**, 23, 773-779.
- ¹⁵⁷ A. Kasza, M. Kowanetz, K. Poslednik, B. Witek, T. Kordula, A. Koj, *Cytokine*, **2001**, 16, 187-190.
- ¹⁵⁸ T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, P. A. Janmey, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **2005**, 60, 24–34.
- ¹⁵⁹ P. C. Georges, W. J. Miller, D. F. Meaney, E. Sawyer, P. A. Janmey, *Biophys J.*, **2006**, 1529.
- ¹⁶⁰ P. C. Georges, P. A. Janmey, *Journal of Applied Physiology*, **2005**, 98, 1547-1553.
- ¹⁶¹ R. J. Pelham, Y. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, 94, 13661.
- ¹⁶² D. A. Joy, X. Feng, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A. U. Krettli, M. Ho, A. Wang, N. J. White, E. Suh, P. Beerli and X. Su, *Science*, **2003**, 300 (5617), 318-321.
- ¹⁶³ L. J. Bruce-Chwatt, *Br. Med. J.*, **1972**, 3, 464-466.
- ¹⁶⁴ N. Tonse, K. Raju, *Pediatrics*, **2006**, 117 (2), 320, 321.
- ¹⁶⁵ M. Chan, *The World Health Report 2008*, World Health Organization, **2008**.
- ¹⁶⁶ R. W. Snow, C. A. Guerra, A. M. Noor, H.Y. Myint, and S. I. Hay, *Nature*, **2005**, 434, 214, 217.
- ¹⁶⁷ R. Tuteja, *FEBS Journal*, **2007**, 274 (18), 4670-4679.
- ¹⁶⁸ T. E. Wellems and C. V. Plowe, *Journal of Infectious Diseases*, **2001**, 184 (6), 770-776.
- ¹⁶⁹ S. L. Perkins, I. N. Sarkar and R. Carter, *Infect Genet Evol*, **2007**, 7, 74-83.
- ¹⁷⁰ M. Aikawa, T. M. Seed, *Academic Press*, **1980**, 1, 285-345.

- ¹⁷¹ L. H. Van Lin, C. J. Janse and A. P. Waters, *Int. J. Parasitol*, **2000**, *30*, 357-370.
- ¹⁷² J. M. Carlton, S. V Angiuoli, B. B. Suh, T. W. Kooij, M. Pertea, J. C. Silva, M.D. Ermolaeva, J. E. Allen, J. D. Selengut, H. L. Koo, J.D. Peterson, M. Pop, D. S. Kosack, M. F. Shumway, S. L. Bidwell, S. J. Shallom, S. E. van Aken, S. B. Riedmuller, T. V. Feldblyum, J. K. Cho, J. Quackenbush, M. Sedegah, A. Shoaibi, L. M. Cummings, L. Florens, J. R. Yates, J. D. Raine, R. E. Sinden, M. A. Harris, D. A. Cunningham, P. R. Preiser, L. W. Bergman, A. B. Vaidya, L. H van Lin, C. J. Janse, A. P. Waters, H. O. Smith, O. R. White, S. L. Salzberg, J. C. Venter, C. M. Fraser, S. L. Hoffman, M. J. Gardner, and D. J. Carucci, *Nature*, **2002**, *419*, 512-519.
- ¹⁷³ Q. Chen, M. Schlichtherle, M. Wahlgren, *Clin Microbiol Rev*, **2000**, *13*, 439-450.
- ¹⁷⁴ M. M. Mota and A. Rodriguez, *Bioessays*, **2002**, *24*, (2).
- ¹⁷⁵ J. P. Vanderberg, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **1974**, *21*, (4), 527-537.
- ¹⁷⁶ P. Sinnis and F. Zavala, *Future Microbiology*, **2008**, *3* (3), 275-278.
- ¹⁷⁷ M. M. Mota, J. C. R. Hafalla, and A. Rodriguez, *Nature Medicine*, **2002**, *8* (11), 1318-1322.
- ¹⁷⁸ M. Prudencio, A. Rodriguez, and M. M. Mota, *Nature Reviews Microbiology*, **2006**, *4* (11), 849-856.
- ¹⁷⁹ A. Sturm, R. Amino, C. van de Sand, T. Regen, S. Retzlaff, A. Rennenberg, A. Krueger, J.-M. Pollok, R. Menard, and V. T. Heussler, *Science*, **2006**, *313* (5791), 1287-1290.
- ¹⁸⁰ M. Aikawa, L. H. Miller, J. Johnson, and J. Rabbege, *Journal of Cell Biology*, **1978**, *77*, (1), 72-82.
- ¹⁸¹ K. Wengelnik, R. Spaccapelo, S. Naitza, K. J. H. Robson, C. J. Janse, F. Bistoni, A. P. Waters, and A. Crisanti, *EMBO Journal*, **1999**, *18*, 5195-5204.
- ¹⁸² A. K. Ghosh, M. Devenport, D. Jethwaney, D. E. Kalume, A. Pandey, V. E. Anderson, A. A. Sultan, N. Kumar, and M. Jacobs-Lorena, *PLoS Pathogens*, **2009**, *5*, (1).
- ¹⁸³ Janina Kristin Baade, *Masterarbeit*, Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg, **2008**.
- ¹⁸⁴ N. S. Morrissette and L. D. Sibley, *Microbiol Mol Biol Rev*, **2002**, *66* (1), 21-38.

- ¹⁸⁵ R. Amino, S. Thiberge, B. Martin, S. Celli, S. Shorte, F. Frischknecht, and R. Menard, *Nature Medicine*, **2006**, 12 (2), 220-224.
- ¹⁸⁶ F. Frischknecht, P. Baldacci, B. Martin, C. Zimmer, S. Thiberge, J. C. Olivo-Marin, S. L. Shorte, and R. Menard, *Cellular Microbiology*, **2004**, 6 (7), 687-694.
- ¹⁸⁷ L. Florens, M. P. Washburn, J. D. Raine, R. M. Anthony, M. Grainger, J. D. Haynes, J. K. Moch, N. Muster, J. B. Sacci, and D. L. Tabb, *Nature*, **2002**, 419, 520-526.
- ¹⁸⁸ L. A. Cameron, P. A. Giardini, F. S. Soo, and J. A. Theriot, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2000**, 1 (2), 110-119.
- ¹⁸⁹ C. A. King, *Parasitology Today*, **1988**, 4 (11), 315-319.
- ¹⁹⁰ S. Schmitz, M. Grainger, S. Howell, L. J. Calder, M. Gaeb, J. C. Pinder, A. A. Holder, and C. Veigel, *Journal of Molecular Biology*, **2005**, 349 (1), 113-125.
- ¹⁹¹ D. G. Russell and R. E. Sinden, *Journal of Cell Science*, **1981**, 50 (1), 345-359.
- ¹⁹² J. R. Forney, D. K. Vaughan, S. Yang, and M. C. Healey, *Journal of Parasitology*, **1998**, 84 (5), 908-13.
- ¹⁹³ M. K. Shaw and L. G. Tilney, *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, **1999**, 96 (16), 9095-9099.
- ¹⁹⁴ D. M. Wetzel, S. Hakansson *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, **2003**, 14 (2), 396-406.
- ¹⁹⁵ S. H. Kappe, C. A. Buscaglia *et al.*, *Trends Parasitol*, **2004**, 20 (1), 13-6.
- ¹⁹⁶ N. Yoshida, R. S. Nussenzweig *et al.*, *Science*, **1980**, 207 (4426), 71-3.
- ¹⁹⁷ P. Sinnis and E. Nardin, *Chem. Immunol*, **2002**, 80, 70-96.
- ¹⁹⁸ U. Frevert, P. Sinnis *et al.*, *J. Exp. Med.*, **1993**, 177 (5), 1287-98.
- ¹⁹⁹ S. P. Sidjanski, J. P. Vanderberg, *et al.*, *Mol. Biochem Parasitol*, **1997**, 90 (1), 33-41.
- ²⁰⁰ R. Menard, *Cell Microbiol.*, **2001**, 3 (2), 63-73.
- ²⁰¹ W. O. Rogers, M. D. Rogers *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol*, **1992**, 53 (1-2), 45-51.

- ²⁰² S. Gantt, C. Persson *et al.*, *Infect. Immun.*, **2000**, 68 (6), 3667-73.
- ²⁰³ K. Kaiser, K. Matuschewski, N. Camargo, J. Ross, and S. H. I. Kappe, *Molecular Microbiology*, **2004**, 51 (5), 1221-1232.
- ²⁰⁴ J. Baum, D. Richard, J. Healer, M. Rug, Z. Krnajski, T. W. Gilberger, J. L. Green, A. A. Holder, and A. F. Cowman, *Journal of Biological Chemistry*, **2006**, 281 (8), 5197.
- ²⁰⁵ J. T. Dessens, A. L. Beetsma, G. Dimopoulos, K. Wengelnik, A. Crisanti, F. C. Kafatos, and R. E. Sinden, *The EMBO Journal*, **1999**, 18, 6221-6227.
- ²⁰⁶ V. Nussenzweig and R. Menard, *Trends in Microbiology*, **2000**, 8 (3), 94-96.
- ²⁰⁷ C. Lacroix and R. Menard, *Trends in Parasitology*, **2008**.
- ²⁰⁸ K. Heiss, S. Nie, H. Kumar, T. M. Daly, L. W. Bergman, and K. Matuschewski., *Cell*, **2008**, 7 (6), 1062-1070.
- ²⁰⁹ M. Meissner, D. Schluter *et al.*, *Science*, **2002**, 298 (5594), 837-840.
- ²¹⁰ A. A. Sultan, V. Thathy *et al.*, *Cell*, **1997**, 90 (3), 511-22.
- ²¹¹ S. Kappe, T. Bruderer *et al.*, *J. Cell Biol.*, **1999**, 147 (5), 937-44.
- ²¹² C. A. Buscaglia, I. Coppens *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, **2003**, 14 (12), 4947-57.
- ²¹³ T. J. Jewett and L. D. Sibley, *Mol. Cell*, **2003**, 11 (4), 885-94.
- ²¹⁴ R. Amino, R. Menard, and F. Frischknecht, *Current Opinion in Microbiology*, **2005**, 8, (4), 407-414.
- ²¹⁵ Sylvia. Münter, B. Sabass, C. Selhuber-Unkel, M. Kudryashev, S. Hegge, U. Engel, J. Spatz, K. Matuschewski, U. S. Schwarz and F. Frischknecht, *Cell Host & Microbe*, **2009**, 6, 551-562.
- ²¹⁶ S. Hegge, S. Münter, M. Steinbüchel, K. Heiss, U. Engel, K. Matuschewski, and F. Frischknecht, *FASEB Journal*, **2010**.
- ²¹⁷ D. R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, **2008**, 89.
- ²¹⁸ Rasterelektronenmikroskopie; L. Reimer, G. Pfefferkorn, Springer Verlag, **1977**.

- ²¹⁹ Scanning Electron Microscopy, L. Reimer, Springer Verlag, **1983**.
- ²²⁰ S. L. Flegler, J.W. Heckman, K.L. Klomparens, Elektronenmikroskopie, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**.
- ²²¹ J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, P. K. Hansma, *Rev. Sci. Instrum.*, **1993**, 64, 403.
- ²²² A. Vinckier, G. Semenza, *FEBS Lett.* **1998**, 430, 12.
- ²²³ G. Sauerbrey, *Zeitschrift für Physik*, **1959**, 155 (2), 206-222, 27, 69, 71.
- ²²⁴ J. Homola, S. S. Yee and G. Gauglitz, *B. Chemical*, **1999**, 54, 1-2, 3-15, 28.
- ²²⁵ G. Ladam, P. Schaaf, G. Decher, J. C. Voegel, and F. J. G. Cuisinier, *Biomolecular Engineering*, **2002**, 19, 2-6, 273-280, 28.
- ²²⁶ H. Elwing, *Biomaterials*, **1998**, 19 (4-5), 397-406, 28.
- ²²⁷ D. L. Elbert, A. B. Pratt, M. P. Lutolf, S. Halstenberg, J. A. Hubbell, *J. Controlled Release*, **2001**, 76, 11.
- ²²⁸ Nadine Perschmann, *Diplomarbeit*, Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg, **2005**.
- ²²⁹ F. Frischknecht, P. Baldacci, B. Martin, C. Zimmer, S. Thiberge, J. C. Olivo-Marin, S. L. Shorte, and R. Menard, *Cell Microbiol.*, **2004**, 6, 687-694.
- ²³⁰ J. Blümmel, N. Perschmann, D. Aydin, J. Drinjakovic, T. Surrey, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, and J. P. Spatz, *Biomaterials*, **2007**, 28, 32, 4739-4747, 69, 71, 88.
- ²³¹ G. Sauerbrey, *Zeitschrift für Physik*, **1959**, 155 (2), 206-222, **1959**, 27, 69, 71.
- ²³² M. Rodahl and B. Kasemo, *A. Physical*, **1996**, 54 (1-3), 448-456, 27, 69.
- ²³³ J. G. Alauzan, S. Young, R. D'Souza, L. Liu, M. A. Brook, *Biomaterials*, **2010**, in press.
- ²³⁴ J. Robert, J.R. Pelham, Yu-Li Wang, *Cell Biology*, **1997**, 94, 13661-13665.
- ²³⁵ A. Wexler, *J. Res. Natl. Bur. Stand. Part, A*, **1977**, 81, 5-19, 56.

- ²³⁶ D. Aydin, I. Louban, N. Perschmann, J. Blümmel, T. Lohmüller, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Fiammengo, H. Kessler and J. P. Spatz, *Langmuir*, in Fertigstellung.
- ²³⁷ W. R. Gombotz, G. Wang, T. A. Horbett, A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1991**, *25*, 1547-1562.
- ²³⁸ K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 10714-10721.
- ²³⁹ N. A. Alcantar, E. S. Aydil, J. N. Israelachvili, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, *51*, 343-351.
- ²⁴⁰ J. Blümmel, J. Cahu, L. Sandblad, C. Schmitz, T. Surrey, J. P. Spatz, *Biophysical Reviews and Letters*, **2009**, *4*, 153–162.
- ²⁴¹ J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- ²⁴² K. R Brown, M. J. Natan, *Langmuir*, **1998**, *14*, 726.
- ²⁴³ T. Lohmüller, E. Bock, J. P. Spatz, *Advanced Materials*, **2008**, *20*, 2297.
- ²⁴⁴ R. L. Juliano and S. J. Haskill, *J. Cell Biol.*, **1993**, *120*, 577–585.
- ²⁴⁵ S. V. Graeter , Ji. Huang , N. Perschmann , M. López-García , H. Kessler , J. Ding , J. P. Spatz, *Nano Lett.* **2007**, *7* (5), 1413-1418.
- ²⁴⁶ S. Hegge, M. Kudryashev, A. Smith, F. Frischknecht, *Biotechnol J.*, **2009**, *4*, 6, 903-13.
- ²⁴⁷ J. P. Vanderberg, *J. Protozool*, **1974**, *21* (4), 527-37.
- ²⁴⁸ A. A. Sultan, V. Thathy, U. Frevert, K. J. H. Robson, A. Crisanti, V. Nussenzweig, R. S. Nussenzweig and R. Menard, *Cell*, **1997**, *90*, 511–522.
- ²⁴⁹ B. J. Morahan, L. Wang and R. L. Coppel, *Cell*, **2008**, *25*, 77-84.
- ²⁵⁰ K. Heiss, H. Nie, S. Kumar, T. M. Daly, L. W. Bergman, K. Matuschewski, *Eukaryot. Cell.* **2008**, *7* (6), 1062-70.
- ²⁵¹ T. J. Jewett and L. D. Sibley, *Cell Press*, **2003**, *11*, 885–894.
- ²⁵² L. P. Cramer, *Current Biology*, **1999**, *9* (19), 1095-10105.

- ²⁵³ M. Kudryashev, S. Lepper, W. Baumeister, M. Cyrklaff, F. Frischknecht, *PMC Biophysics*, **2010**, 3, 6.
- ²⁵⁴ S. Lepper, M. Merkel, A. Sartori, M. Cyrklaff, F. Frischknecht, *J. Microsc.*, **2010**, 238 (1), 21-6.
- ²⁵⁵ D. M. Wetzell, S. Håkansson, K. Hu, D. Roos, und L. D. Sibley, *Molecular Biology of the Cell*, **2003**, 14, 396–406.
- ²⁵⁶ N. Perschmann, J. Blümmel, I. Louban, R. Fiammengo, H. Kessler, and J. P. Spatz, Substantial Tunable Hydrogel Interfaces For Biological Applications, in Fertigstellung.
- ²⁵⁷ J. K. Hellmann, S. Münter, M. Wink, F. Frischknecht, *PLoS ONE*, **2010**, 5, 1, 8682.
- ²⁵⁸ C. Kebaier, J. P. Vanderberg, *International Journal for Parasitology*, **2010**, 40, 25–33.
- ²⁵⁹ J. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, Amin Arnaout, *Science*, **2002**, 296, 152-154.
- ²⁶⁰ J. Huang, S. Gräter, F. Corbellini, S. Rinck, E. Bock, R. Kemkemer, H. Kessler, J. Ding, J. P. Spatz, *Nanoletters*, **2009**, 9, 1111-1116.
- ²⁶¹ H. Schüler, A. Mueller and K. Matuschewski, *FEBS Lett.*, **2005**, 579, 655-660.
- ²⁶² S. Schmitz, M. Grainger, S. Howell, L. J. Calder, M. Gaeb, J. C. Pinder, A. A. Holder and C. Veigel, *J. Mol. Biol.*, **2005**, 349, 113–125.
- ²⁶³ N. Perschmann, J. K. Hellmann, K. Heiss, K. Matuschewski, A.-K. Müller, F. Frischknecht and J. P. Spatz, Malaria parasite motility on soft and nano-patterned substrates, **2010**, in Fertigstellung.
- ²⁶⁴ Dr. Friedrich Frischknecht, Das Geheimnis der Sporoziten – auf dem Weg zu neuen Medikamenten gegen die Malaria, *Spiegel der Universität Heidelberg*, **2010**.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Joachim P. Spatz für die Möglichkeit bedanken, dieses interessante, interdisziplinäre Projekt bearbeiten zu dürfen. Ich hatte alle Freiheiten in der Behandlung des Themas und konnte dabei auf seine Unterstützung bauen. Apl. Prof. Dr. Reiner Dahint danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenfalls geht mein Dank an Prof. Dr. Rainer H. A. Fink für sein Einverständnis sich als zusätzlichen Prüfer bereitzustellen. Allen beteiligten Prüfern danke ich für die Mühe sich mit den verschiedenen Themenkomplexen zu beschäftigen.

Für die Bearbeitung administrativer Arbeiten in diesem Arbeitskreis möchte ich mich ganz besonders bei Frau Ulshöfer, Frau Schönig-Erdinger, Frau Pfeilmeier, Frau Hess und Frau Boczek bedanken. Ebenso ein großes Dankeschön an die Werkstatt, an Herrn Reinhold Jehle, an die Elektronikexperten Herrn Jeschka und Herrn Meinusch und an das gesamte Team, welches in diesem Institut für die Sauberkeit sorgt. Dr. Ilia Louban danke ich für die Durchführung der AFM-Messungen.

Ein besonders großes Dankeschön geht an Janina Hellmann für die erfolgreiche, tolle und freundschaftliche Kooperation bei der Bearbeitung des Malaria-Projektes. An dieser Stelle natürlich auch großen Dank an ihren Chef Dr. Friedrich Frischknecht für seine Unterstützung.

Dem gesamten Arbeitskreis Spatz danke ich für die angenehme, freundliche Atmosphäre. Vielen Dank an Jacques Blümmel der mich bereits schon zu Anfang der Arbeit sehr hilfreich unterstützte und sich zu einem sehr wertgeschätzten Freund entwickelt hat. Besonderer Dank geht an meine Bürokollegen Nicole Plath, Martin Streichfuss, Tamas Haraszi. Danke für die schöne gemeinsame Zeit, Hilfsbereitschaft, interessante Gespräche privater und fachlicher Art und die Freundschaft. Genauso danke ich Vera C. Hirschfeld-Warneken, Mercedes Dragovits, Theresa Pohl, Marcus

Abel, Julia Ranzinger, Katharina Klein, Ada Cavalcanti-Adam, Jasmin Zahn, Sebastian Rausch ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft, viele gemeinsame Mittagessen und eine tolle freundschaftliche Zeit. In diesem Zuge möchte ich mich bei allen bedanken, die Teile dieser Arbeit gelesen haben. Vielen Dank auch Kristen Mills für das spontane Lesen des englischen Teils. Ein riesen Dankeschön auch an meinen KungFu Meister Christian Kronmüller und Jiao Lian Alexander Kahler sowie die gesamte KungFu-Truppe für den Ausgleich und die freundschaftliche Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt und gefördert haben. Besonderer Dank geht an meine Schwester Nicole, die mir immer mit offenen Ohren und unterstützenden Worten zur Seite stand und mir gezeigt hat, was man alles bewältigen kann. Schließlich noch ein besonderes Dankeschön an meinen Freund Michael der mich durch das gesamte Studium und die Promotion begleitet hat. Danke für die Geduld, die Unterstützung und für jeden gemeinsamen Tag.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den.....

Nadine Perschmann